

Entwicklung und Anwendung von superauflösender Fluoreszenzmikroskopie

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Carsten Forthmann
aus Wiesbaden

1. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Philip Tinnefeld
2. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Karl-Heinz Gericke
eingereicht am:	11.02.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	30.05.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

1. C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang und P. Tinnefeld, *Superresolution microscopy based on engineered dark states*. J Am Chem Soc, 2008. 130(50): p. 16840–16841.
2. J. Vogelsang, T. Cordes, C. Forthmann, C. Steinhauer und P. Tinnefeld, *Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106(20): p. 8079-8080.
3. T. Cordes, I. Stein, C. Forthmann, C. Steinhauer, M. Walz, W. Summerer, B. Person, J. Vogelsang und P. Tinnefeld, *Controlling the emission of organic dyes for high sensitivity and superresolution microscopy*. Proc SPIE, 2009. 7367.
4. T. Cordes, M. Strackharn, S. Stahl, W. Summerer, C. Steinhauer, C. Forthmann, E. Puchner, J. Vogelsang, H. Gaub und P. Tinnefeld, *Resolving single-molecule assembled patterns with superresolution blink-microscopy*. Nano Letters, 2010. 10: p. 645-651.
5. R. Kasper, B. Harke, C. Forthmann, P. Tinnefeld, S. Hell und M. Sauer, *Single-molecule STED with photostable organic fluorophores*. SMALL, 2010. 6(13): p. 1379-1384.
6. J. Vogelsang, T. Cordes, C. Steinhauer, C. Forthmann und P. Tinnefeld, *Intrinsically resolution enhancing probes for confocal microscopy*. Nano Letters, 2010. 10(2): p. 672–679.
7. J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, T. Cordes, B. Person, I. Stein und P. Tinnefeld, *Make Them Blink: Fluorescent Probes for Super-resolution Microscopy*. ChemPhysChem, 2010. 11(12): p. 2475-2490.
8. C. Steinhauer, C. Forthmann, R. Jungmann, J. Vogelsang, F. Simmel und P. Tinnefeld, *Nanoscopy Using Localization and Temporal Separation of Fluorescence from Single Molecules*, in *Biophotonics: Spectroscopy, Imaging*,

- Sensing, and Manipulation*, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics, B. D. Bartolo, J. Collins (Eds.), Springer. 2011.
9. D. Smith, V. Schüller, C. Forthmann, R. Schreiber, P. Tinnefeld und T. Liedl, *A structurally variable hinged tetrahedron framework from DNA origami*. Journal of Nucleic Acids 2011.
10. T. Cordes, J. Vogelsang, C. Steinhauer, I. Stein, C. Forthmann, A. Gietl, J. Schmied, G. Acuña, S. Laurien, B. Lalkens und P. Tinnefeld, *Far-Field Nanoscopy with Conventional Fluorophores: Photostability, Photophysics & Transient Binding, in Springer Series on Fluorescence, Volume on "Far-Field Optical Nanoscopy"*, Series Editor: O. Wolfbeis, Volume Editors: P. Tinnefeld, C. Eggeling, S.W. Hell. 2012.
11. M. Itano, C. Steinhauer, J. Schmied, C. Forthmann, P. Liu, A. Neumann, N. Thompson, P. Tinnefeld und K. Jacobson, *Super-resolution Imaging of C-type lectin and Influenza Hemagglutinin nanodomains on plasma membranes using Blink Microscopy*. Biophys. J., 2012. 102(7): p. 1534–1542.
12. J. Schmied, A. Gietl, P. Holzmeister, C. Forthmann, C. Steinhauer, T. Dammeyer und P. Tinnefeld, *Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami*. Nat. Methods, 2012. 9: p. 1133–1134.
13. C. Forthmann, J. Schmied, E. Pibiri, B. Lalkens, P. Nickels, T. Liedl und P. Tinnefeld, *DNA origami nanopillars as standards for three-dimensional superresolution microscopy*. Nano Letters, 2013. 13(2): p. 781-785.

Tagungsbeiträge

„*Superresolution Microscopy on the Basis of Engineered Dark States*“ (Poster), NIM Winter School 2009 “Nanosystems and Sensors”, 01.03.-07.03.2009, St. Anton, Österreich

„*Superresolution Microscopy on the Basis of Engineered Dark States*“ (Poster), 15th Anniversary International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences", 15.09.-18.09.2009, Berlin

„*DNA origami based fluorescence standards*“ (Vortrag), 18th International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences", 05.09.-07.09.2012, Berlin

Inhalt

0. Überblick.....	8
1. Einleitung.....	9
2. Theoretische Grundlagen.....	13
2.1 Photophysikalische Grundlagen	13
2.1.1 Das Prinzip der Fluoreszenz	13
2.1.2 Fluktuation der Fluoreszenzintensität.....	17
2.1.3 Stimulierte Emission	20
2.2 Die Theorie der optischen Auflösung und Super-Auflösung.....	20
2.2.1 Das Beugungslimit nach Abbe	20
2.2.2 Das Prinzip der STED-Mikroskopie.....	22
2.2.3 Das Prinzip der lokalisierungsbasierten Mikroskopie.....	25
2.3 Biologische Grundlagen	29
2.3.1 Die DNA-Origami-Technik.....	29
2.3.2 Aktinfilamente	31
2.3.3 Fibroblasten	31
3. Material und Methoden	33
3.1 Der Versuchsaufbau.....	33
3.1.1 Der Laser	34
3.1.2 Der Anregungsstrahlengang	34
3.1.3 Das Mikroskop	34
3.1.4 Die Technik der totalen internen Reflexion.....	35
3.1.5 Der Detektionsstrahlengang.....	35
3.1.6 Die Kamera.....	36
3.1.7 Dreidimensionale Mikroskopie	37
3.2 Vorbereitung der Proben	39
3.2.1 BSA-Biotin-Oberflächen	39
3.2.2 Aktinfilamente in vitro	41
3.2.3 Aktinfilamente in fixierten Zellen.....	41
3.2.4 Aktinfilamente in lebenden Zellen	42
3.2.5 Herstellung von DNA-Origami-Strukturen.....	42
3.3 Bildgenerierung in der Lokalisierungsmikroskopie	44
4. Ergebnisse und Diskussion.....	45
4.1 Theoretische Betrachtungen in der Superauflösungsmikroskopie	45

Inhalt

4.1.1 Kombination der STED-Mikroskopie mit ROXS.....	45
4.1.2 Optimierung der Integrationszeit in der Blink-Mikroskopie.....	49
4.2 Superauflösung an Filamenten des Zytoskeletts	54
4.2.1 Aktinfilamente In vitro.....	54
4.2.2 Aktinfilamente in fixierten Zellen.....	56
4.2.3 Aktinfilamente in lebenden Zellen	58
4.2.4 Anfärbung durch Verwendung von Nanokörpern.....	60
4.3 Erzeugung regulärer Gitterstrukturen aus Fluorophoren.....	62
4.3.1 Simulationen	62
4.3.2 Verwendung eines Rasterkraftmikroskops	64
4.4 Anwendung der PAINT-Mikroskopie auf DNA-Origami-Strukturen.....	68
4.4.1 Tetraeder	69
4.4.2 Six-Helix-Bundles.....	70
4.4.3 Photoinduziertes Bleichen von PAINT-Anbindungsstellen.....	75
4.4.4 DNA-Chip.....	77
4.5 Verwendung von DNA-Origami-Strukturen als Standards für die Super-Auflösung 79	
4.5.1 Abstandsmessungen auf rechteckigen DNA-Origami-Strukturen	80
4.5.2 Automatisierte Auswertung von Abstandsmessungen.....	84
4.5.3 Standards für dreidimensionale Superauflösungsmikroskopie	89
5. Ausblick	100
6. Referenzen	102
7. Abbildungsverzeichnis	109
8. Danksagung.....	112

0. Überblick

Für eine drastische Erweiterung des Anwendungsfeldes der optischen Mikroskopie sorgte die in den letzten Jahren aufgekommene sogenannte Superauflösungsmikroskopie. Das klassische Modellsystem, um das Auflösungsvermögen derartiger Techniken zu vergleichen und zu quantifizieren, stellen Komponenten des eukaryontischen Zytoskeletts dar. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden derartige Zellstrukturen verwendet und anhand dessen ein quantitativer Wert für die Auflösung der Blink-Mikroskopie erhalten. Das System der Wahl waren dabei Aktinfilamente in vitro, in fixierten und in lebenden Zellen. Darüberhinaus wurde auch ein deutlich systematischerer Ansatz verfolgt, indem eine Matrix aus gezielt angeordneten Farbstoffmolekülen als Vergleichssystem verwendet wurde. Dabei wurde die gezielte Platzierung sowohl virtuell in Monte-Carlo-Simulationen, als auch real mithilfe eines Rasterkraftmikroskops durchgeführt. Die Platzierung von Farbstoffmolekülen durch die Verwendung von Rasterkraftmikroskopie wies allerdings einige Nachteile auf, wie etwa eine sehr aufwändige Durchführung und das Fehlen einer Möglichkeit zur Parallelisierung. Aus diesem Grund wurde im Folgenden auf die sogenannte DNA-Origami-Technik zurück gegriffen, um gezielte Farbstoffanordnungen zu generieren. Diese dienten nun als Testprobe sowohl für die Blink-Mikroskopie, als auch für die superauflösenden Techniken PAINT und SHRIMP. Schließlich wurden DNA-Origamis als generelle Auflösungsstandards für die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie etabliert, wobei zur automatisierten Auswertung ein spezieller Algorithmus entwickelt wurde. Die Erweiterung auf den dreidimensionalen Fall gelang durch die Nutzung von Astigmatismus-basierter 3D-Lokalisierungsmikroskopie und die Verwendung einer speziell dafür designten dreidimensionalen DNA-Origami-Struktur. Die Möglichkeit einer unkomplizierten Auswertung wurde auch in diesem Fall durch die Entwicklung eines automatisierten Detektionsalgorithmus sichergestellt.

1. Einleitung

1. Einleitung

Viele Fortschritte in den Bereichen Mikrobiologie, Medizin und verwandten Wissenschaftsgebieten sind eng verknüpft mit dem Aufkommen immer besserer Mikroskopie-Methoden. So war die Entdeckung der Zelle überhaupt erst möglich, als die ersten einfachen Lichtmikroskope zur Verfügung standen. Diese waren jedoch noch nicht in der Lage, die Zellen detailreich aufzulösen.[1] Das lag vor allem daran, dass die erzielbare Auflösung durch Beugungseffekte prinzipiell begrenzt ist, wobei der Wert dieser Schranke proportional zur Wellenlänge des verwendeten Lichtes ist. Dieses Gesetz wird nach Ernst Abbe auch als Abbe'sches Beugungslimit bezeichnet.[2] Aus diesem Grund blieb das Wissen über den genauen Aufbau einer biologischen Zelle und die Form und Struktur von Zellbestandteilen, wie z.B. Mitochondrien, weiterhin sehr lückenhaft. Der große Durchbruch auf diesem Gebiet gelang erst, als in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts die Elektronenmikroskopie aufkam.[1] Diese Technik verwendet zur Abbildung der Probe kein Licht sondern einen Elektronenstrahl. Auch dafür gilt prinzipiell das Abbe'sche Beugungslimit, jedoch ist die Wellenlänge eines Elektronenstrahls durch dessen Energie frei einstellbar, wodurch sich die Auflösungsgrenze somit beliebig reduzieren lässt. Dadurch liefert die Bildgebung durch Elektronenmikroskopie nahezu beliebig scharfe Abbildungen von Zellstrukturen bis hinunter zur molekularen Ebene. Auf diese Weise konnten nun zelluläre Substrukturen im Detail untersucht und deren Funktionsweise aufgeklärt werden. Allerdings funktioniert diese Technik nur unter sehr aufwendiger Probenpräparation. Dies führt ebenso dazu, dass die Proben nicht unter biologischen Bedingungen beobachtbar sind, was für viele Anwendungen jedoch erforderlich ist. Eine ebenso gute Auflösung wird durch Methoden erreicht, deren Funktionsprinzip in der Abtastung der Probe mithilfe einer dünnen Spitze besteht. Dazu zählen beispielsweise die Rastertunnelmikroskopie[3] und die Rasterkraftmikroskopie[4]. Die Rastertunnelmikroskopie liefert atomare Auflösung, ist jedoch auf elektrisch leitfähige Proben beschränkt, da die Bildgebung bei dieser Methode über die Messung eines Tunnelstroms zwischen Spitze und Probe erfolgt. Die Rasterkraftmikroskopie nutzt dagegen molekulare Kräfte zwischen Spitze und Probe und unterliegt somit dieser Beschränkung nicht. Allerdings erfordert diese Technik flache oberflächennahe Proben und ist damit ebenso wie die Elektronenmikroskopie nicht biokompatibel. Es wurden also weitere hochauflösende Methoden benötigt, die eine höhere Biokompatibilität aufweisen. Die Basis dafür war die Fluoreszenzmikroskopie, die als Form der Lichtmikroskopie zwar ebenfalls dem Beugungslimit unterliegt, jedoch Raum gibt, dieses mit physikalischen oder chemischen Tricks zu umgehen. Eine Methode, die dieses tut, wird als superauflösend

1. Einleitung

bezeichnet. Die erste Technik, die darauf aufbauend das Beugungslimit umging, war die STED-Mikroskopie, die die Auflösung erhöht, indem sie den Lichtfokus verkleinert.[5] Eine andere Form der superauflösenden Mikroskopie wurde mit der sogenannten Lokalisierungsmikroskopie (STORM, PALM, dSTORM, etc.) etabliert.[6-9] Diese basiert auf präziser Lokalisierung zeitlich separiert leuchtender Emitter. Die verschiedenen lokalisierungsbasierten Methoden unterscheiden sich hauptsächlich darin, wie die zeitliche Separation der Emission realisiert wird. So nutzt beispielsweise die in dieser Arbeit häufig verwendete selbst entwickelte Blink-Mikroskopie[10] chemisch induziertes intrinsisches Blinken von Farbstoffmolekülen[11], während die ebenfalls verwendete PAINT-Mikroskopie mithilfe von Bindungskinetik[12, 13] ein Pseudoblinken erzeugt. Diese optischen Superauflösungsmethoden können nun angewandt werden, um zelluläre Strukturen unter physiologischen Bedingungen detailreich aufzuklären. So konnte zum Beispiel kürzlich gezeigt werden, dass sich die STED-Mikroskopie auf lebendes Gehirngewebe anwenden lässt[14] und somit ein bildgebendes Verfahren darstellt, welches im medizinischen Bereich Anwendung finden kann. Auch mit lokalisierungsbasierten Mikroskopie-Techniken sind Anwendungen dieser Art möglich. Beispielsweise ist es gelungen, Dynamiken von Zellorganellen am lebenden Organismus aufzuklären.[15] Aufgrund dieses großen Potenzials, welches das Feld der superauflösenden Mikroskopie für die medizinische und biologische Forschung und Anwendung aufweist, ist in diesem Bereich eine sehr dynamische Entwicklung zu beobachten, die u.a. bereits zu einem kommerziellen Vertrieb einiger superauflösender Techniken durch namhafte Mikroskopiehersteller geführt hat.[16, 17]

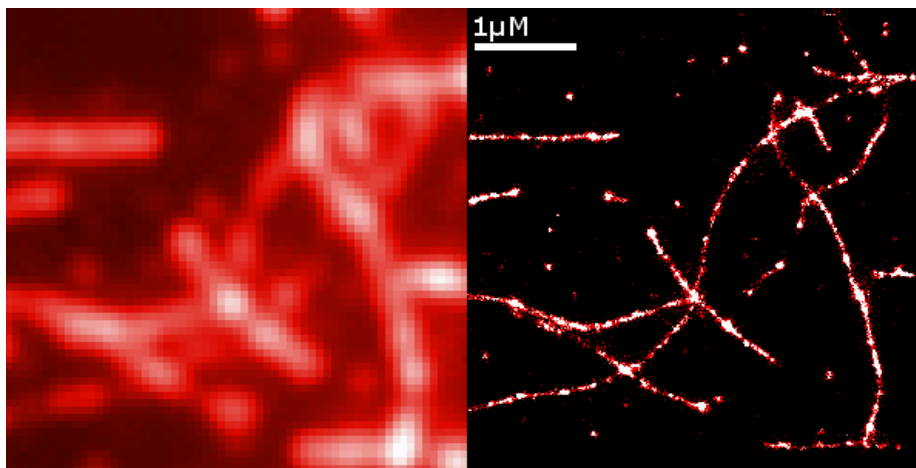


Abbildung 1.1: Beugungsbegrenzte (links) und durch Blink-Mikroskopie superaufgelöste Aufnahme (rechts) von immobilisierten Aktinfilamenten.

1. Einleitung

Die überwältigende Vielzahl an zur Verfügung stehenden Superauflösungsmethoden erfordert nun allerdings eine Möglichkeit zur standardisierten Vergleichbarkeit, um die verschiedenen Techniken einander gegenüberstellen zu können. Konventionell werden dafür in der Regel zelluläre Strukturen, wie z.B. Teile des eukaryontischen Zytoskeletts verwendet, also Aktinfilamente oder Mikrotubuli.[8, 18-24] Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun auf solche Strukturen zurückgegriffen und anhand dieser das Auflösungsvermögen der Blink-Mikroskopie untersucht.[10, 25] Die Filamente wurden dafür auf verschiedene Weise bereitgestellt. Zum Einen wurden sie in vitro synthetisiert und anschließend immobilisiert, was bezogen auf den Präparationsaufwand den einfachsten Fall darstellte. Zum Anderen wurden ebenso native Filamente aus eukaryontischen Zellen verwendet, wobei die Blink-Mikroskopie sowohl auf fixierte als auch auf lebende Zellen angewandt wurde. Sowohl im Fall der in-vitro-Immobilisierung, als auch im Fall der fixierten Zellen konnte das Auflösungsvermögen mit dieser Methode quantifiziert werden. Dieses Vorgehen weist jedoch den Nachteil auf, dass die genaue Anordnung dieser Strukturen nicht reproduzierbar ist, d.h. dass bei jeder neuen Messung ein vollkommen anderes Muster vorliegt. Um dieses Problem zu umgehen, kam in dieser Arbeit eine weitere Modellprobe zur Auflösungsbestimmung zur Anwendung. Diese bestand in einer Struktur aus mithilfe eines Rasterkraftmikroskops regulär angeordneten Farbstoffmolekülen.[26] Die Struktur hatte nicht mehr den Nachteil der Irreproduzierbarkeit, war allerdings aufwendig und nicht parallelisierbar in der Herstellung. Dieses Problem wurde schließlich durch die DNA-Origami-Technik gelöst[27], welche es ermöglicht, DNA in definierte Nanostrukturen zu falten. An diese DNA-Origamis können zusätzlich beliebige Moleküle in definierter Konfiguration angeknüpft werden. Damit war es also erstmals möglich, parallelisierte Strukturen herzustellen, die Farbstoffmoleküle in gewünschter Anzahl und in vorgegebenen Abständen zu einander enthalten. Diese konnten nun genutzt werden, um Auflösungsstandards zu generieren, die sowohl einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit, als auch eine unkomplizierte Herstellung aufweisen.[28] Das ermöglichte erstmals systematische Vergleiche verschiedener Superauflösungsmethoden. Schließlich konnte ebendiese DNA-Origami-Technik verwendet werden, um besagte Standards auf drei Dimensionen zu erweitern.[29], wodurch nun auch Auflösungslineale für dreidimensionale Superauflösungsmikroskopie entwickelt werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden experimentelle Ansätze für diese Superauflösungsstandards erarbeitet. Ein Schwerpunkt lag ferner auf der Entwicklung von Algorithmen zur beschleunigten, automatisierten Auswertung. Eine solche automatisierte Auswertung sollte zudem sicherstellen, dass eine objektive Beurteilung der Messung nach quantifizierbaren

1. Einleitung

Kriterien vorliegt. Bei manuellem Auswählen der zu vermessenden Strukturen könnte es sonst zu einer subjektiven Verzerrung der Messung durch den Experimentator kommen. Es kann nun davon ausgegangen werden, dass diese neuen Standards in naher Zukunft breite Anwendung finden und sich im gesamten Feld der Superauflösungsmikroskopie etablieren werden. Dies wird von großer Bedeutung sein, damit besagte Techniken weiter verbessert und optimiert werden können. Profitieren wird davon in besonderem Maß die biologische und medizinische Forschung, die durch weiter verbesserte optische Bildgebung die Möglichkeit erhält, biologische Prozesse auf zellulärer Ebene noch detailreicher studieren zu können.

2. Theoretische Grundlagen

2. Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die, für diese Arbeit relevanten theoretischen Grundlagen erläutert. Dabei wird zunächst auf die wichtigen photophysikalischen Prinzipien eingegangen, die für die gewählten Fluoreszenzfarbstoffe und deren Anwendungen von Bedeutung sind. Ein Großteil dieses Kapitels wird ferner das Feld der super-auflösenden optischen Mikroskopie beleuchten, wobei der Schwerpunkt auf die lokalisierungsbasierte Mikroskopie gelegt wird. Abschließend wird darüberhinaus auf die Chemie und Biologie der verwendeten Proben eingegangen.

2.1 Photophysikalische Grundlagen

Zum Verständnis dieser Arbeit ist es zunächst erforderlich, sich mit einigen photophysikalischen Prinzipien zu befassen. Darauf wird nun im Folgenden eingegangen.

2.1.1 Das Prinzip der Fluoreszenz

Um die Wechselwirkung von Molekülen mit Licht zu verstehen, ist es erforderlich, sich mit den möglichen Besetzungen der elektronischen Energieniveaus des betrachteten Moleküls zu befassen. Diese werden im Folgenden als Zustände bezeichnet. Hierbei werden zunächst sogenannte Singulett- und Triplett-Zustände unterschieden. Ein Singulett-Zustand liegt vor, wenn die sogenannten Spins, also die quantenmechanischen Eigendrehimpulse des Elektronenpaares antiparallel ausgerichtet sind. Sind diese parallel, so wird von einem Triplett-Zustand gesprochen. Der energetisch niedrigste Zustand wird als Grundzustand bezeichnet. Dieser ist erreicht, wenn sich beide Elektronen auf dem niedrigsten Energieniveau befinden. Sind zwei Elektronen im selben Energieniveau, so ist gemäß des Pauli'schen Ausschließungsprinzips eine parallele Ausrichtung ihrer Spins nicht möglich, woraus folgt, dass der Grundzustand immer ein Singulett-Zustand ist. Da die Energiedifferenz zwischen dem Singulett-Grundzustand und dem ersten angeregten Singulett-Zustand einen deutlich höheren Wert hat als die bei Raumtemperatur thermisch zur Verfügung stehende Energie, kann in guter Näherung davon ausgegangen werden, dass sich jedes Molekül im Grundzustand befindet. Die einzige relevante Möglichkeit, aus dem Grundzustand ausgehend höher energetische Zustände zu bevölkern, besteht somit in der optischen Anregung des Moleküls, d.h. der Absorption eines Photons. Die Energie eines Photons ist dabei gegeben durch:

2. Theoretische Grundlagen

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

Wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit und λ die Lichtwellenlänge bezeichnen.

Hat das Molekül ein solches Photon passender Energie absorbiert, so wird es in den nächst höheren Singulett-Zustand angeregt. In der Regel weist dieser Zustand eine Lebensdauer von einigen Nanosekunden auf, bevor das Molekül in den Grundzustand zurück fällt. Wird die dabei frei werdende Energie in Form von Licht abgegeben, d.h. wird ein Photon emittiert, so wird dies mit Fluoreszenz bezeichnet. Beim Vergleich der Wellenlängen des Anregungslichtes und des Fluoreszenzlichtes fällt auf, dass das Fluoreszenzlicht gegenüber dem Anregungslicht eine Rotverschiebung aufweist. Um das zu verstehen, ist erforderlich, zwischen den elektronischen Übergängen die Bewegung der Atomkerne des Moleküls in Betracht zu ziehen. In Abbildung 2.1 ist die Energie des Moleküls in Abhängigkeit einer willkürlichen Kernkoordinate einmal für den Grundzustand und einmal für den ersten angeregten Zustand aufgetragen.

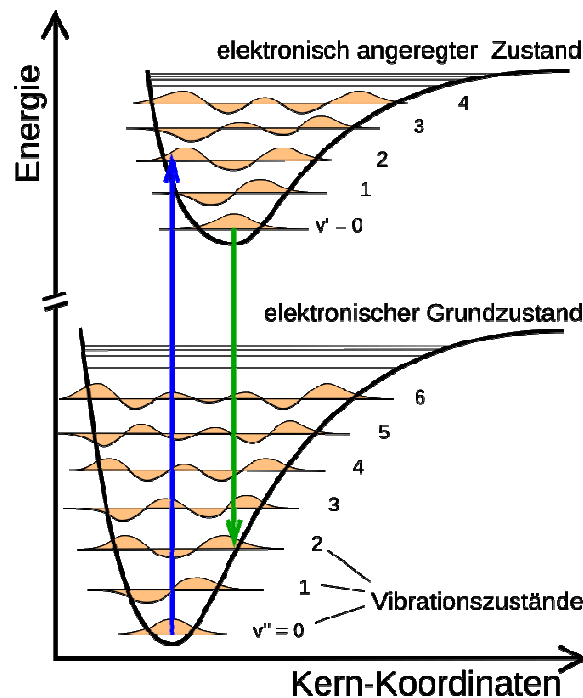


Abbildung 2.1: Verlauf des Kernkoordinatenpotenzials für zwei verschiedene elektronische Zustände. Ebenfalls eingetragen sind die sich ergebenden Vibrationsniveaus. Die, der Stokes-Verschiebung zu Grunde liegende, Energiedifferenz zwischen Anregung (blau) und Fluoreszenz (grün) ist verdeutlicht.[30]

2. Theoretische Grundlagen

Diese Potenzialkurven weisen jeweils ein Minimum auf, dessen Position der Gleichgewichtskernkoordinate entspricht. Innerhalb des elektronischen Grundzustandes existieren also weitere Energieniveaus, die verschiedenen Stufen der Schwingungsanregung der Kerne entsprechen. Diese Zustände werden daher Vibrationsniveaus genannt. Der bei Raumtemperatur mit höchster Wahrscheinlichkeit besetzte Zustand ist auch hier der Grundzustand. Aufgrund der Tatsache, dass die Kernmasse um einige Größenordnungen höher ist als die Elektronenmasse, läuft die Bewegung der Kerne um ein Vielfaches langsamer ab als die elektronischen Übergänge. Die daraus folgende näherungsweise mögliche Separierbarkeit von Kern- und Elektronenbewegung wird als sogenannte Born-Oppenheimer-Näherung bezeichnet. Direkt daraus ableiten lässt sich das sogenannte Franck-Condon-Prinzip, welches folgendes besagt: Während eines elektronischen Überganges wird sich die Kernkoordinate gemäß der Born-Oppenheimer-Näherung nicht ändern. Somit verläuft in einem Kernkoordinate-Energie-Diagramm die Verbindungslinie zwischen dem Anfangs- und dem Endzustand des elektronischen Überganges stets senkrecht zur Kernkoordinatenachse. Es wird daher von „senkrechten“ Übergängen gesprochen. Welches Vibrationsniveau des elektronischen „Zielzustandes“ bei diesem Übergang nun bevölkert wird, hängt von dem Verlauf der Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der Kernkoordinate in den jeweiligen Vibrationszuständen ab. Da sich die Kernkoordinate während des Überganges ja nicht ändern wird, werden solche Übergänge bevorzugt, welche eine möglichst hohe Überlappung der Wahrscheinlichkeitsdichten in Anfangs- und Endzustand aufweisen. Wird der Verlauf der Potenzialkurve als näherungsweise harmonisch angenommen, folgt daraus, dass die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der Kernkoordinate im Schwingungsgrundzustand ein Maximum an der Gleichgewichtskernkoordinate aufweist, während sich für höher angeregte Vibrationsniveaus jeweils zwei globale Maxima ergeben, deren Abstand zur Gleichgewichtskernkoordinate mit der Höhe des Vibrationsniveaus zunimmt. Sind nun die Gleichgewichtskernkoordinaten des elektronischen Grundzustandes und des ersten angeregten elektronischen Zustandes nicht dieselben, was im Allgemeinen der Fall ist, wird ein elektronischer Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes, also die Anregung des Moleküls mit Licht, nicht in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustandes führen. Vielmehr wird am wahrscheinlichsten der Schwingungszustand bevölkert, dessen Wahrscheinlichkeitsmaximum am ehesten auf der Gleichgewichtskernkoordinate des elektronischen Grundzustandes liegt. Somit ist die zu überbrückende Energiedifferenz bei der Absorption höher als der energetische Abstand zwischen den

2. Theoretische Grundlagen

Schwingungsrundzuständen der beiden elektronischen Zustände. Bevor nun das auf diese Weise angeregte Molekül seine Energie über Fluoreszenz wieder abgibt, kommt es in der Regel zur Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustandes. Der von dort ausgehende Übergang in den elektronischen Grundzustand, also die Fluoreszenz, wird nun analog zum Absorptionsprozess nicht den Schwingungsgrundzustand bevölkern, sondern den Schwingungszustand mit dem „passendsten“ Verlauf der Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte. Von dort aus erfolgt dann die erneute strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand. Die bei der Fluoreszenz frei werdende Energie ist somit geringer als der energetische Abstand zwischen den Schwingungsrundzuständen der beiden elektronischen Zustände und damit deutlich geringer als die, für den Absorptionsprozess notwendige Energie. Dies erklärt die eingangs erwähnte Rotverschiebung, die das Fluoreszenzlicht gegenüber dem Anregungslicht aufweist. Dieses Phänomen wird als sogenannte Stokes-Verschiebung bezeichnet. Dies ist in Abbildung 2.2 veranschaulicht.

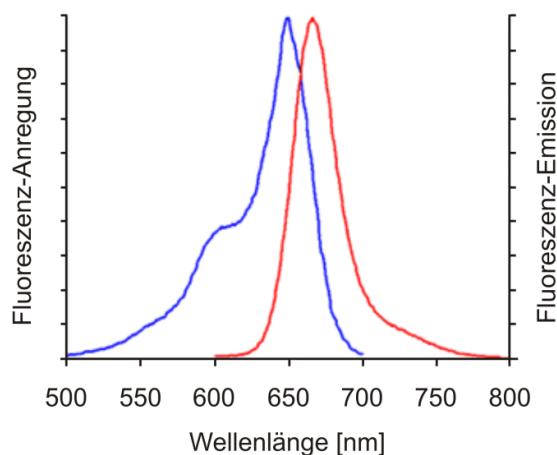


Abbildung 2.2: Unterschied zwischen Absorptionsspektrum (blau) und Emissionsspektrum (rot) eines typischen Farbstoffs verursacht durch die Stokes-Verschiebung.[31]

Diese Stokes-Verschiebung ermöglicht eine einfache spektrale Trennung zwischen Anregungslicht und Fluoreszenzlicht und ist somit in der technischen Anwendung von großer Bedeutung. Ein Übergang aus dem elektronisch angeregten Zustand in den Grundzustand führt allerdings nicht immer zur Emission eines Photons. Alternativ kann die frei werdende Energie auch thermisch über sogenannte interne Konversion abgegeben werden. In diesem Fall wird nicht von Fluoreszenz gesprochen. Da die Fluoreszenz aber in der Regel die gewünschte Übergangsart darstellt, ist der Quotient

2. Theoretische Grundlagen

aus Fluoreszenzrate k_{Fl} und Gesamtübergangsrate eine wichtige Farbstoffkenngröße, die als Fluoreszenz-Quantenausbeute bezeichnet wird:

$$\Phi = \frac{k_{Fl}}{k_{Fl} + k_{Rest}} \quad (2.2)$$

2.1.2 Fluktuation der Fluoreszenzintensität

In den bisherigen Ausführungen wurden lediglich die ersten beiden Singulett-Zustände und deren Übergänge Absorption und Emission, also Fluoreszenz betrachtet. Ein solches System würde die Beobachtung eines mehr oder weniger konstanten und zeitlich unbegrenzten Fluoreszenzsignals nach sich ziehen, sofern dauerhafte Lichtanregung vorläge. Tatsächlich werden in der Regel aber fluktuierende Fluoreszenzsignale beobachtet, die zudem immer von begrenzter Dauer sind. Um das zu verstehen, ist die Betrachtung weiterer möglicher Zustände des Farbstoffmoleküls notwendig. Diese sind in Abbildung 2.3 veranschaulicht.

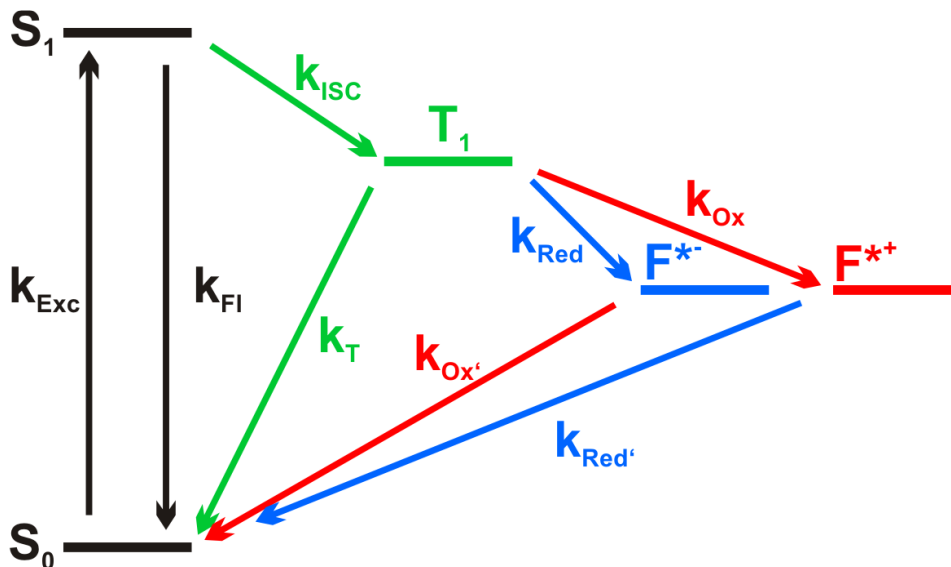


Abbildung 2.3: Jablonski-Diagramm eines typischen Farbstoffs. Neben Singulett- und Triplett-Zustand sind auch der reduzierte und der oxidierte Radikalzustand eingezeichnet.

Ein solcher Zustand ist der im letzten Abschnitt erwähnte Triplett-Zustand. Dieser wird durch sogenannte Interkombination aus dem angeregten Singulett-Zustand bevölkert. Da dieser Übergang im Gegensatz zu den bisher diskutierten Übergängen die Multiplizität nicht erhält, ist er im isolierten Fall quantenmechanisch verboten, kann also nur durch Wechselwirkung mit einem anderen System erfolgen. Das führt dazu, dass der Übergang

2. Theoretische Grundlagen

relativ unwahrscheinlich und die Übergangsrate somit relativ gering ist. Der Übergang aus dem Triplett in den Singulett-Grundzustand verletzt ebenfalls die Multiplizität und ist somit unwahrscheinlich. Das führt dazu, dass die Lebensdauer des Triplett im Bereich von einigen Mikrosekunden liegt und der Zustand somit um mehrere Größenordnungen langlebiger ist als der angeregte Singulett-Zustand ist, dessen Lebensdauer auf der Zeitskala von wenigen Nanosekunden liegt. Generell muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass der Begriff Lebensdauer nicht die tatsächliche Verweildauer eines bestimmten Moleküls in einem Zustand angibt, sondern stets den Erwartungswert einer exponentiellen Verteilung. Diese lange Triplett-Lebensdauer macht sich in einer beobachteten Fluktuation der Fluoreszenzintensität bemerkbar, da das Farbstoffmolekül keine Photonen aussendet, solange es sich im Triplett-Zustand befindet.[32, 33] Der Triplett wird daher auch als Dunkelzustand bezeichnet. Die Rückführung des Triplett in den Grundzustand geschieht in der Regel durch Reaktion mit in der Umgebung gelöstem Triplett-Sauerstoff. Erfolgt dieser Übergang unter Aussendung von Licht, so wird in diesem Fall von Phosphoreszenz gesprochen. Der Sauerstoff wird dabei allerdings in die Singulett-Form überführt, welche stark reaktiv ist und in einer weiteren Reaktion mit dem Farbstoffmolekül dessen Photozentrum irreversibel zerstören kann. Da diese Reaktion zu einem sofortigen Verlust des Fluoreszenzsignals führt, wird sie auch als Photobleichen bezeichnet.[34, 35] Das Photobleichen ist eines der größten Probleme der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie. Ein gängiger Lösungsansatz zur Reduktion dieses Effektes besteht darin, der umgebenden Lösung den Sauerstoff zu entziehen. Dies ist beispielsweise möglich zur Zugabe des Sauerstoff verbrauchenden Enzyms Glucose-Oxydase und dessen Substrat Glucose.[36] Dadurch wird allerdings die Übergangsrate aus dem Triplett in den Grundzustand deutlich gesenkt, was eine erhebliche Verlängerung der Triplett-Lebensdauer bis in den Bereich von einigen Millisekunden zur Folge hat. Eine derart lange Triplett-Lebensdauer führt zu deutlich sichtbaren Auszuständen in der Fluoreszenzspur, als sogenanntes Blinken bezeichnet, was in manchen Anwendungen durchaus erwünscht sein kann, in der Regel allerdings die durchgeführte Messung beeinträchtigt. Dieses Problem lässt sich jedoch durch das Ausnutzen weiterer möglicher Zustände eines Farbstoffmoleküls umgehen. Bei diesen Zuständen handelt es sich um sogenannte Radikalzustände. In einen solchen Zustand gelangt das Molekül, wenn ihm entweder ein Elektron hinzugefügt oder weggenommen wird. Im Fall der Elektronenzugabe wird von einem reduzierten Zustand und im Fall der Elektronenwegnahme von einem oxidierten Zustand gesprochen. Die Übergangsraten in diese Zustände hängen von der Konzentration der in der Umgebung gelösten Reduktions- bzw. Oxidationsmittel ab. Die Übergangsrate der Rückführung in den Grundzustand hängt

2. Theoretische Grundlagen

wiederum von der Konzentration des jeweils komplementären Redoxmittels ab. Ist beispielsweise entweder ein Oxidations- oder ein Reduktionsmittel in der Umgebung des Farbstoffmoleküls in ausreichender Konzentration präsent (in der Regel im oberen mikromolaren bis millimolaren Bereich), so wird der entsprechende Radikalzustand effizient aus dem Triplett-Zustand bevölkert, wobei die Rückführung weiterhin unwahrscheinlich und die Lebensdauer des Radikalzustandes somit lang ist. Enthält die Lösung allerdings sowohl Reduktions-, als auch Oxidationsmittel in ausreichender Konzentration, so sind sowohl die Übergangsrate in als auch aus den Radikalzuständen stark erhöht. Das führt letztlich zu einer schnellen Rückführung des Triplett in den Grundzustand mit dem Umweg entweder über den reduzierten oder den oxidierten Radikalzustand. Dadurch werden sowohl Photobleichen reduziert, als auch Dunkelzustände auf eine Regel nicht mehr detektierbare Länge verkürzt. Das Ergebnis ist ein stabiles gleichförmiges Fluoreszenzsignal. Dieses System aus Reduktions- und Oxidationsmittel wird als ROXS (*reducing and oxidizing system*, reduzierendes und oxidierendes System) bezeichnet.[11]

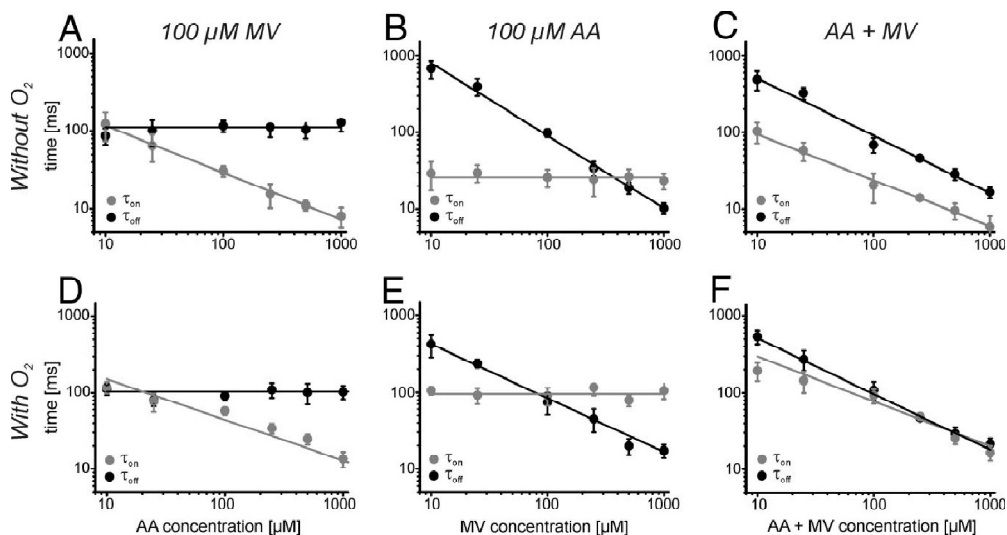


Abbildung 2.4: Abhängigkeit der An- und Auszeiten des Oxazinfarbstoffes ATTO655 von der Konzentration eines Reduktionsmittels (AA) und eines Oxidationsmittels (MV).[25]

Damit lässt sich also bei Fluoreszenzfarbstoffen entweder Blinken generieren, wobei die Länge der An- und Auszeiten über die Konzentration der Redoxmittel[25] und die Intensität der Laseranregung[37] im Prinzip frei einstellbar sind, oder Blinken nahezu vollständig verhindern und gleichmäßige stabile Fluoreszenz erzeugen. Beides wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit Anwendung finden. Abbildung 2.4 zeigt die Möglichkeit, An- und Auszeiten durch Veränderung der Umgebungsbedingungen einstellen zu können.[25]

2. Theoretische Grundlagen

2.1.3 Stimulierte Emission

Alle bisher besprochenen lumineszenten, also Licht aussendenden Übergänge waren sogenannte spontane Emissionen. Spontan bedeutet dabei, dass die Aussendung des Photons ohne direkte Ursache und zu einem zufällig Zeitpunkt geschieht, der nicht vorherzusagen, sondern nur durch Wahrscheinlichkeiten zu beschreiben ist, in der Regel durch eine Exponentialverteilung. Im Gegensatz dazu gibt es noch die sogenannte stimulierte Emission. Diese Art der Lichtaussendung entsteht bei der Wechselwirkung eines angeregten Moleküls mit einem Photon. Entspricht die Energie des Photons genau der Energiedifferenz zwischen dem angeregten Zustand, in dem sich das Molekül befindet, und einem beliebigen energetisch tieferliegenden Zustand, und ist der Übergang zwischen den beiden Zuständen quantenmechanisch erlaubt, so wird das Photon ebendiesen Übergang induzieren. Die dabei frei werdende Energie führt zur Emission eines weiteren Photons. Die Energie des Photons ist dabei gegeben durch die Energiedifferenz der beiden Zustände und entspricht somit exakt der Energie des stimulierenden Photons. Ebenso sind die beiden Photonen in Phase und Ausbreitungsrichtung identisch. Eine sehr verbreitete Anwendung dieses Effektes ist der LASER (*light **a**mplification by **s**timulated **e**mission of **r**adiation*, Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung), der dieses Prinzip des „Photonenkopierens“ nutzt, um stark gebündeltes und kohärentes Licht zu erzeugen. Desweiteren basiert die super-auflösende STED-Methode auf dem Effekt der stimulierten Emission.[5] Diese wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels genauer besprochen.

2.2 Die Theorie der optischen Auflösung und Super-Auflösung

In diesem Teil wird zunächst die Beschränkung, die sich aus der Wellennatur des Lichtes und den daraus resultierenden Beugungseffekten für die optische Auflösung ergibt, dargelegt. Daran anschließend werden dann einige gängige Lösungsansätze vorgestellt und erläutert.

2.2.1 Das Beugungslimit nach Abbe

Um das Beugungslimit der optischen Auflösung zu verstehen, ist es zweckmäßig, zunächst als Modellstruktur ein einfaches reguläres Gitter mit der Gitterkonstante d zu betrachten. Dieses Gitter soll auf eine Detektionsoberfläche abgebildet werden. Wellenoptisch lässt sich eine solche Abbildung als doppelte Fourier-Transformation

2. Theoretische Grundlagen

verstehen, d.h. die Fourier-transformierte der Probe wird auf die, sich zwischen Probe und Abbild befindende sogenannte Fourier-Ebene abgebildet. Deren Fourier-transformierte wiederum wird schließlich auf die Detektionsfläche abgebildet. Da eine doppelte Fourier-Transformation das Ausgangsbild exakt reproduziert, läge der Schluss nahe, dass auch die Abbildung in der Mikroskopie die Originalstruktur exakt wiedergibt. Dies wäre in der Tat so, wenn Abbildungsoptik unendlicher Ausdehnung verwendet würde. In der Realität ist es aber so, dass nicht das vollständige Fourier-Bild zur Rücktransformation zur Verfügung steht, sondern nur der Teil, der die Apertur des Objektivs passieren kann. Die Information, die den übrigen Bereichen des Fourier-Bildes steckt, geht verloren. Die Rücktransformation erzeugt somit ein fehlerbehaftetes Abbild der Originalstruktur. Dies lässt sich auch quantifizieren: Vereinfacht lässt sich annehmen, dass die Strukturinformation genau dann erhalten bleibt, wenn mindestens die erste Beugungsordnung der Struktur durch die Apertur transmittiert wird. Für den Ablenkungswinkel φ der k -ten Beugungsordnung gilt:

$$\sin\varphi_k = \frac{k\lambda}{d} \quad (2.3)$$

Dabei ist λ die Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Für $k = 1$ ergibt sich also:

$$\sin\varphi_1 = \frac{\lambda}{d} \quad (2.4)$$

Für den Fall, dass zwischen der Probe und der abbildenden Optik kein Vakuum herrscht, sondern sich ein Medium mit dem Brechungsindex n befindet, muss die Wellenlänge um ebendiesen Faktor korrigiert werden:

$$\sin\varphi_1 = \frac{\lambda}{nd} \quad (2.5)$$

Für den Fall, dass die erste Beugungsordnung gerade noch durch die Apertur gelangt, entspricht der Beugungswinkel φ genau dem halben Öffnungswinkel α des Objektivs. Damit muss also gelten:

$$\sin\alpha = \frac{\lambda}{nd} \quad (2.6)$$

Für gegebene Werte von α , λ und n lässt sich also der kleinstmögliche Abstand d , der noch aufzulösen ist angeben als

$$d = \frac{\lambda}{n\sin\alpha} = \frac{\lambda}{NA} \quad (2.7)$$

Dabei wird das Produkt aus dem Brechungsindex und dem Sinus des halben Öffnungswinkels häufig als sogenannte numerische Apertur (NA) bezeichnet. In den bisherigen Überlegungen wurde immer von einer symmetrischen Fourier-Ebene ausgegangen. In diesem Fall impliziert das Vorhandensein der Beugungsordnung $k = 1$

2. Theoretische Grundlagen

auch das der Ordnung $k = -1$. Tatsächlich wäre diese aber gar nicht erforderlich. Wird beispielsweise durch schräge Beleuchtung die nullte Beugungsordnung an den einen Rand der Apertur verschoben, so genügt es, wenn die erste Beugungsordnung genau auf den gegenüberliegenden Rand der Apertur trifft. Somit ergibt sich eine Verbesserung der Auflösung um den Faktor 2:

$$d = \frac{\lambda}{2n\sin\alpha} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.8)$$

Diese Gleichung wurde erstmals von Ernst Abbe hergeleitet und wird daher als Abbe'sches Auflösungslimit oder auch Abbe'sches Beugungslimit bezeichnet.[38] Da die Größen n und α technisch bzw. geometrisch bedingt nicht beliebig einstellbar sind und insbesondere biologische Proben nicht beliebig hohe Photonenenergien vertragen, ist das Beugungslimit ein großes Problem in der optischen Mikroskopie. Im Folgenden werden nun einige Möglichkeiten vorgestellt, diese Auflösungsbeschränkung zu umgehen.

2.2.2 Das Prinzip der STED-Mikroskopie

Die erste Methode, die in der Lage war, das Abbe'sche Beugungslimit zu brechen, war die sogenannte STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*, Löschung durch stimulierte Emission). Die STED-Mikroskopie ist eine Methode der konfokalen Mikroskopie deren Funktionsweise im folgenden nun kurz erklärt wird: Die zu untersuchende Probe wird in diesem Verfahren illuminiert, indem ein Laserstrahl mittels Objektiv auf die Probe fokussiert wird. Dieser Laserfokus wird auch Anregungsfokus genannt und seine Breite genügt der Abbe'schen Gleichung. Befinden sich im Bereich des Fokus fluoreszierende Moleküle so wird deren Licht ebenfalls mittels Objektiv auf eine Photodiode, also auf einen idealisiert punktförmigen Detektor abgebildet. Der Bereich der Probe, aus dem ausgesandtes Licht den Detektor erreichen kann wird als Detektionsfokus bezeichnet. Dieser lässt sich im Prinzip als Abbildung der Detektorfläche auf die Probe betrachten und würde daher für einen tatsächlich punktförmigen Detektor ebenfalls der Abbe-Formel genügen. Im Idealfall liegen beide Foki exakt aufeinander, woraus sich der Begriff „konfokal“ ableitet. Die Bildgebung entsteht nun durch eine rasterförmige Relativbewegung zwischen der Probe und den beiden Foki. Dies wird auch als Scan bezeichnet. Wie bereits erwähnt unterliegen beide Foki dem Abbe'schen Beugungslimit, welches die optische Auflösung begrenzt auf den durch Gleichung 2.8 gegebenen Wert begrenzt. Bei der STED-Mikroskopie wird nun der Anregungsfokus mit einem weiteren Laserfokus, dem sogenannten STED-Fokus überlagert. Dessen Wellenlänge ist in der Regel deutlich rotverschoben und liegt am energetisch unteren Rand des

2. Theoretische Grundlagen

Emissionsspektrums des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes. Desweiteren ist der STED-Fokus so deformiert, dass er statt eines zentralen Helligkeitsmaximums eine ringförmige Maximallinie konzentrisch zum Mittelpunkt besitzt. Im Zentrum weist er dagegen eine Nullstelle auf. Diese Fokus-Form wird auch als Donut bezeichnet. Diese Form wird mithilfe einer Phasenplatte generiert, die konzentrisch im parallelen STED-Strahl platziert wird. Abbildung 2.5 zeigt einen typischen STED-Aufbau mit einer solchen Phasenplatte. Diese erzeugt an jedem Punkt der Platte eine Phasenverzögerung des Lichtes, die genau den Wert seines Polarwinkels hat, also kontinuierlich von 0 bis 2π reicht. Für zwei Lichtstrahlen, die an jeweils gegenüberliegenden Punkten die Phasenplatte passieren, gilt nun folgendes: Da die Polarwinkeldifferenz der beiden Phasenplattenpunkte genau π beträgt, weisen die beiden Lichtstrahlen einen Phasenunterschied auf, der ebenfalls den Wert π hat. Treffen die beiden Lichtstrahlen nun im Fokus in dessen Zentrum zusammen, so kommt es aufgrund des Phasenunterschiedes von π und derselben optischen Weglänge zu vollständiger destruktiver Interferenz. Treffen die beiden Strahlen jedoch im Fokus mit einem bestimmten Abstand zur Mitte aufeinander, gleicht die unterschiedliche Weglänge die Phasendifferenz aus und es kommt zu konstruktiver Interferenz. Dies lässt sich auf alle, die Phasenplatte passierenden Lichtstrahlen verallgemeinern, wodurch sich das besagte ringförmige Fokusprofil ergibt. Dieser donutförmige STED-Fokus wird nun dazu verwendet, Fluoreszenzfarbstoffmoleküle selektiv auszuschalten. Das Ausschalten erfolgt dabei über die bereits erklärte stimulierte Emission, indem jedes Farbstoffmolekül, das sich im angeregten Zustand befindet, zur stimulierten Emission angeregt wird, bevor der Übergang in den Grundzustand spontan passieren kann. Das Farbstoffmolekül emittiert also keine detektierbaren Fluoreszenzphotonen mehr und ist somit effektiv dunkel.

2. Theoretische Grundlagen

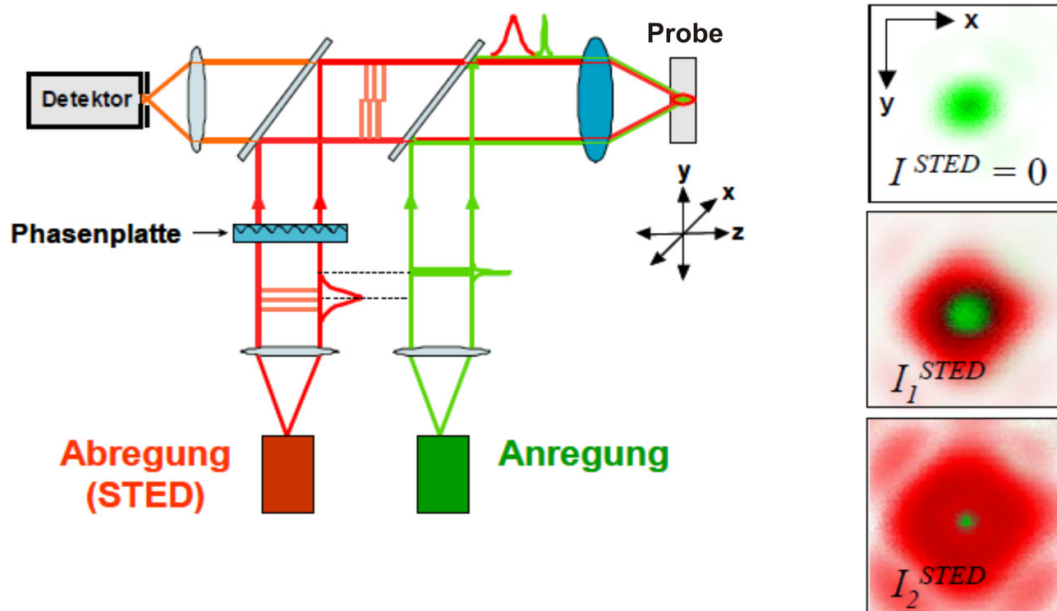


Abbildung 2.5: Links ist der typische Aufbau eines STED-Mikroskops gezeigt. Der rechte Teil der Abbildung veranschaulicht die Verringerung der Breite des Anregungsfokus bei steigender STED-Intensität.[39]

Das funktioniert allerdings nur, wenn die, bei der stimulierten Emission entstehenden Photonen vollständig herausgefiltert werden. Deshalb ist es zweckmäßig, die Wellenlänge des STED-Strahls so zu wählen, dass sie am äußeren Rand des Emissionsspektrums des Fluoreszenzfarbstoffmoleküls liegt. Auf diese Weise lassen sich die stimulierten Photonen gut spektral herausfiltern, ohne, dass dabei nennenswert Fluoreszenzsignal anderer Moleküle verlorengeht. Die Abhängigkeit der Effizienz des Ausschaltens durch stimulierte Emission von der Intensität des STED-Strahls zeigt ein Sättigungsverhalten, sie steigt zunächst an, um sich dann ab einer bestimmten STED-Intensität jedoch asymptotisch dem Wert 1 anzunähern. Die Intensität, ab der die Sättigung eintritt, wird Sättigungsintensität I_{sat} genannt. Auf die Donutform des STED-Fokus übertragen bedeutet das, dass ein Farbstoffmolekül, welches sich genau im Zentrum des Fokus befindet, volles Fluoreszenzsignal liefert. Mit zunehmendem Abstand zur Fokusmitte erhöht sich jedoch die auf das Molekül wirkende STED-Intensität. Erreicht diese die Sättigungsintensität, kann das Molekül als vollständig ausgeschaltet betrachtet werden. Der Abstand zum Mittelpunkt, ab dem die Sättigungsintensität erreicht wird, sinkt mit steigender Maximalintensität. Das ist in Abbildung 2.5 verdeutlicht. Die effektive Breite des Anregungsfokus ergibt sich nun aus ebendiesem Abstand und hängt wie folgt von der STED-Intensität I ab:

2. Theoretische Grundlagen

$$d = \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}} \quad (2.9)$$

Theoretisch ist die mit STED erreichbare optische Auflösung also unbegrenzt. Tatsächlich gibt es allerdings einige Beschränkungen, die beispielsweise aus der Photostabilität der verwendeten Farbstoffe oder der nicht unbegrenzt möglichen Höhe der STED-Intensität herrühren.[5]

2.2.3 Das Prinzip der lokalisierungsbasierten Mikroskopie

Die im letzten Abschnitt diskutierte STED-Mikroskopie ist ausschließlich in der konfokalen Mikroskopie anwendbar. Um das Beugungslimit auch in der anderen Form der Fluoreszenzmikroskopie, der sogenannten Weitfeldmikroskopie umgehen zu können, werden daher andere Techniken benötigt, die in diesem Teil nun vorgestellt werden. Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, wird bei der Weitfeldmikroskopie die Probe nicht mittels eines fokussierten Laserstrahls beleuchtet, sondern mithilfe eines parallelen Strahls großflächig ausgeleuchtet. Die von der Probe ausgesandten Fluoreszenzphotonen werden dann durch ein Objektiv auf einen Flächendetektor, in der Regel eine CCD-Kamera, abgebildet. Die Bildgebung erfolgt somit im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie im Prinzip instantan. Genau wie in der konfokalen Mikroskopie herrscht in der Weitfeldmikroskopie das Abbe'sche Beugungslimit. Die Abbildung auf dem Detektor gibt die Probe nicht exakt sondern verlustbehaftet wieder. Strukturinformationen ab einer bestimmten Ortsfrequenz gehen verloren. Im Fall eines punktförmigen Objektes bedeutet das, dass dieses nicht als Punkt sondern als ausgedehnte Intensitätsverteilung abgebildet wird. Die Funktion, durch die diese Intensitätsverteilung beschrieben wird, heißt PSF (*point spread function*, Punktabbildungsfunktion). Für den Fall einer rotationssymmetrischen Abbildungsoptik, was normalerweise gegeben ist, ist diese Funktion eine sogenannte Airy-Scheibe. Eine solche ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Die Breite dieser Funktion ist dabei gegeben durch das Abbe'sche Beugungslimit (Gleichung 2.8). Das Abbild einer Struktur, die aus mehreren Punktlichtquellen besteht, ist daher eine Superposition aus den einzelnen PSFs. Ist der Abstand der einzelnen Punktlichtquellen im Bereich von d oder geringer, so wird die Überlappung der PSFs dazu führen, dass diese nicht mehr separierbar sind und die Strukturinformation somit verlorenggeht. Liegt eine Punktlichtquelle jedoch einzeln vor, kann sie trotz der Ausdehnung der PSF präzise lokalisiert werden.

2. Theoretische Grundlagen

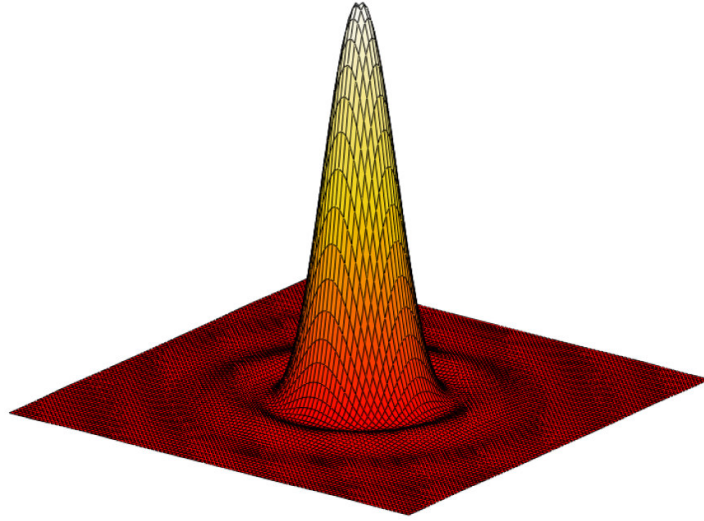


Abbildung 2.6: PSF beschrieben durch eine Airy-Scheibe

Dies geschieht in der Regel dadurch, dass die detektierte PSF mit einer passenden Funktion gefittet wird. Um Rechenressourcen zu sparen wird als solche meistens keine Airy-Scheibe, sondern eine, diese ausreichend gut annähernde, zweidimensionale Gauß-Funktion der Form

$$f(x, y) = Ae^{-\frac{1}{2}\left(\left(\frac{x-x_0}{\sigma_x}\right)^2 + \left(\frac{y-y_0}{\sigma_y}\right)^2\right)} \quad (2.10)$$

Verwendet. Die zur detektierten PSF am besten passende Funktion dieser Form liefert die Koordinaten der Punktlichtquelle x_0 und y_0 . Die Präzision, mit der diese Lokalisierung möglich ist, hängt im Wesentlichen von der Anzahl der detektierten Photonen ab. Dabei kann jedes detektierte Photon als eine Ortsmessung der Genauigkeit d betrachtet werden. Der mittlere Fehler des Mittelwertes einer Messreihe, in der jede Einzelmessung den Fehler Δx aufweist, ist gegeben durch:

$$\Delta x_m = \frac{1}{\sqrt{n}} \Delta x \quad (2.11)$$

Dabei bezeichnet n die Anzahl der in der Messreihe durchgeführten Messungen. Der mittlere Fehler bei der Lokalisierung einer Punktlichtquelle ergibt sich also in Abhängigkeit der Photonenzahl N zu

$$d_{lok} = \frac{d}{\sqrt{N}} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA \cdot \sqrt{N}} \quad (2.12)$$

Tatsächlich ist die real erreichte Lokalisierungsgenauigkeit zumeist etwas schlechter, da zudem beispielsweise Hintergrundrauschen und die Rasterung der Detektorfläche eine Rolle spielen.[40] Die Möglichkeit, einzelne Punktlichtquellen präzise zu lokalisieren bildet nun die Basis zahlreicher super-auflösender Methoden der Weitefeldmikroskopie. Die Idee

2. Theoretische Grundlagen

ist dabei folgende: Gelingt es, Farbstoffmoleküle nicht über die gesamte Aufnahmezeit leuchten zu lassen, sondern das Fluoreszieren auf einige kurze Zeitabschnitte zu begrenzen, und gelingt es ferner, dass dies für alle Farbstoffmoleküle in einem Bereich asynchron erfolgt, so ergibt sich daraus die Möglichkeit, diese zeitlich zu separieren. Das bedeutet konkret, dass die Farbstoffmoleküle nicht mehr gleichzeitig fluoreszieren und somit die PSFs nicht mehr überlappen. Damit lässt sich jedes Farbstoffmolekül einzeln detektieren und mit der weiter oben hergeleiteten Präzision lokalisieren. Ist dies für jedes Farbstoffmolekül erfolgt, lässt sich daraus ein super-aufgelöstes Bild rekonstruieren. Das Prinzip ist in Abbildung 2.7 verdeutlicht.

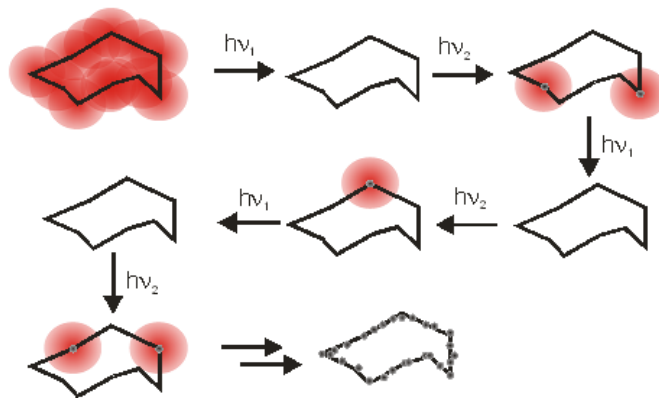


Abbildung 2.7: Prinzip der Auflösungserhöhung durch Schalten und Lokalisieren: Sobald ein Farbstoffmolekül einzeln leuchtet, kann es lokalisiert werden. Alle Lokalisierungen ergeben am Ende die Rekonstruktion der untersuchten Struktur.

Die verschiedenen Super-Auflösungs-Methoden, die dieses Verfahren nutzen unterscheiden sich im Prinzip lediglich darin, auf welche Art und Weise sie die benötigten Dunkelzustände bei den Farbstoffmolekülen generieren. Im Folgenden werden nun einige davon kurz vorgestellt: Die älteste derartige Mikroskopie-Technik ist die sogenannte STORM-Methode (*stochastic optical reconstruction microscopy*, stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie).[7] Diese Methode verwendet ein Paar aus einem Molekül des Farbstoffs Cy5 und einem Molekül des Farbstoffs Cy3 als photoschaltbare Fluoreszenzeinheit.[41] Das Cy3-Molekül fungiert dabei als sogenannter Aktivator, während das Cy5-Molekül als Reporter bezeichnet wird. Das detektierte Fluoreszenzsignal stammt dabei ausschließlich von dem Cy5-Molekül. Der Schaltprozess in den Auszustand geschieht in diesem System spontan, während der Prozess des Anschaltens durch Laseranregung des Cy3-Moleküls aktiv induziert wird. Eine weitere Methode stellt die sogenannte PALM-Methode (*photoactivated localization microscopy*,

2. Theoretische Grundlagen

lichtaktivierte Lokalisierungsmikroskopie) dar, die als photoschaltbare Einheiten fluoreszierende Proteine nutzt.[6] Eine Variante der STORM-Methode, die direktes Schalten von Cy5 ohne Anwesenheit eines Aktivators verwendet, ist dSTORM (**direct STORM**). Diese setzt eine spezielle chemische Umgebung voraus und funktioniert mittlerweile nicht nur für Cy5, sondern auch für eine ganze Reihe weiterer Farbstoffe.[8, 21] Die im Rahmen dieser Arbeit am häufigste verwendete Methode der Super-Auflösung ist die Blink-Mikroskopie.[10] Diese Technik erzeugt die Dunkelzustände durch Induzierung von intrinsischem Blinkverhalten, welches bereits in Kapitel 2.1.2 diskutiert wurde. Ein gänzlich anderer Mechanismus liegt der sogenannte PAINT-Methode (**points accumulation for imaging in nanoscale topography**, Punktanhäufung für die Bildgebung in der Topographie auf der Nanometerskala) zugrunde.[12, 13] Im Gegensatz zu anderen lokalisierungsbasierten Methoden basiert PAINT nicht auf der Erzeugung von An- und Auszuständen bei Farbstoffmolekülen. Stattdessen wird ein Signalblinken dadurch erzeugt, dass die zu untersuchende Probe nicht mit fest angebondenen Farbstoffmolekülen versehen wird, sondern lediglich mit reversiblen Anbindungsstellen. Realisiert wird das in der Regel durch die Ausnutzung von DNA-DNA-Wechselwirkungen (DNA-PAINT, im Folgenden vereinfacht als PAINT bezeichnet). Als Anbindungsstelle wird ein kurzer (8 - 10 Basen) DNA-Einzelstrang an die Probe gebunden. Zusätzlich wird der farbstoffmarkierte Gegenstrang frei diffundierend in der Umgebung gelöst. Auf diese Weise kommt es zu stochastischem An- und Abbinden des Farbstoffmoleküls an die Probe, was unter Sicherstellung der Unsichtbarkeit des Farbstoffs in Lösung (z.B. durch Anregung in TIRF-Konfiguration) zu einem „Blinken“ der Anbindungsstelle führt. Dieses Blinken kann analog zu anderen lokalisierungsbasierten Verfahren genutzt werden, um ein superaufgelöstes Bild zu rekonstruieren. Ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wurde die sogenannte SHRImp-Methode (**single-molecule high-resolution imaging with photobleaching**, hochauflösende Einzelmolekül-Bildgebung durch Photobleichen).[42] Obwohl diese Technik ebenfalls lokalisierungsbasiert ist, unterscheidet diese sich von anderen Methoden dadurch, dass sie ohne die Generierung von Auszuständen auskommt. Stattdessen wird simples Photobleichen durchgeführt. Die Signalspur n photobleichender Moleküle weist im Idealfall n unterscheidbare Stufen auf. Die Lokalisierung der einzelnen Farbstoffmoleküle erfolgt dann iterativ. Zunächst werden die Fluoreszenz-Spots, die aus den Frames der n -ten Stufe gewonnen wurden lokalisiert. Dies ergibt die Position des n -ten Moleküls. Anschließend wird das mittlere Fluoreszenzsignal dieser Frames von der gesamten Spur subtrahiert. Auf diese Weise ergibt sich nun eine Spur mit $n - 1$ Stufen. Aus der letzten Stufe dieser Spur lässt sich jetzt die Position des $n-1$ ten Moleküls bestimmen. Das Verfahren kann nun solange

2. Theoretische Grundlagen

wiederholt werden, bis die Positionen aller n Moleküle ermittelt worden sind und somit ein supraaufgelöstes Bild erstellt werden kann. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Lokalisierung sehr genau ist (bis auf wenige Nanometer). Das gilt allerdings nur für kleine n , da für zu große n zum einen die nutzbare Photonenzahl stark abnimmt und zum anderen Separierung der einzelnen Stufen zunehmend unsicher wird. Somit ist SHRImp eine Methode, die sich besonders gut für Proben eignet, deren Farbstoffanzahl bekannt und gering ist.

2.3 Biologische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden nun die als Probe verwendeten biomolekularen und biologischen Strukturen erläutert und deren Aufbau beschrieben.

2.3.1 Die DNA-Origami-Technik

Eine sehr effiziente Methode zur Erzeugung von definierten Nanostrukturen stellt die sogenannte DNA-Origami-Technik dar. DNA ist ein Polymer, welches aus einzelnen sogenannten Nukleotiden besteht. Ein Nukleotid wiederum setzt sich aus einem Phosphat-Ion, einem Ribosemolekül und einer aus vier möglichen Stickstoffbasen zusammen. Phosphat und Ribose dienen dabei der longitudinalen Verknüpfung der Nukleotide zu einem Polymer. Ein solches, rein longitudinal verknüpftes Nukleotid-Polymer wird DNA-Einzelstrang genannt. Die charakteristische Eigenschaft eines individuellen DNA-Einzelstranges ist die Abfolge der Stickstoffbasen der Nukleotide. Diese wird als DNA-Sequenz bezeichnet. Jede Stickstoffbase ist entweder ein Adenin- (A), Guanin- (G), Thymin- (T) oder Cytosinmolekül (C). Mittels Wasserstoffbrückenbindungen können nun zu einander komplementäre Basen ebenfalls eine Verknüpfung herstellen. Komplementär sind dabei Adenin zu Thymin, welche über eine doppelte Wasserstoffbrücke verbunden werden können, und Guanin zu Cytosin, die mithilfe einer dreifachen Wasserstoffbrücke eine Verbindung eingehen können. Bei Raumtemperatur gehen DNA-Einzelstränge komplementärer Sequenz auf diese Weise eine stabile Verbindung ein. Diese wird dann als DNA-Doppelstrang bezeichnet. Ein solcher liegt beispielsweise als Träger der Erbinformation in jeder lebenden Zelle vor.[1] Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur führen zunehmend zur Auftrennung von DNA-Doppelsträngen. Diejenige Temperatur, bei der diese Auftrennung geschieht, wird

2. Theoretische Grundlagen

als Schmelztemperatur bezeichnet. Diese ist umso höher, je länger der DNA-Einzelstrang und je höher der GC-Gehalt der Sequenz ist.

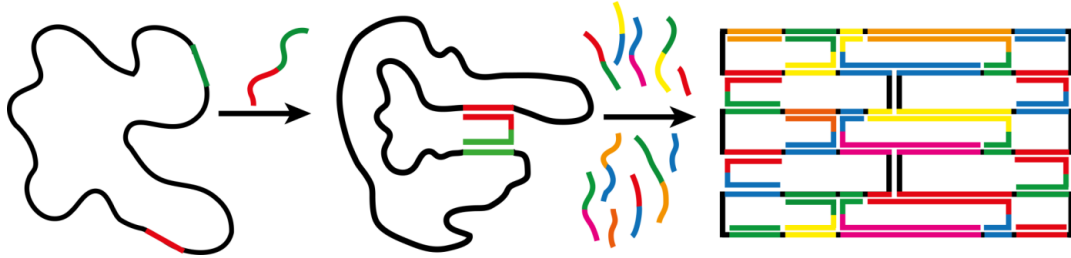


Abbildung 2.8: Prinzip der DNA-Origami-Technik. Durch die Komplementarität der *staple*-Sequenzen (bunt) zu bestimmten Abschnitten der *scaffold*-Sequenz (schwarz) wird der *scaffold* in eine genau definierte Form gezwungen.

Die DNA-Origami-Technik nutzt nun genau diese Eigenschaften der DNA aus: Das Grundgerüst der zu erzeugenden Nanostruktur bildet ein langer DNA-Einzelstrang (in der Regel 7 bis 8 kb), der sogenannte *scaffold* (engl. Rückgrat). In der Praxis wird dafür zumeist das Genom eines Bakteriophagen verwendet. Mithilfe einer Vielzahl von kürzeren DNA-Einzelsträngen, den sogenannten *staples* (engl. Tacker), wird der *scaffold* nun gezielt in sich verknüpft. Diese interne Verknüpfung des *scaffold* geschieht dadurch, dass die Sequenzen der *staples* so gewählt werden, dass sie partiell komplementär zu verschiedenen Abschnitten der *scaffold*-Sequenz sind und diese dadurch miteinander verbinden. Das Prinzip ist in Abbildung 2.8 veranschaulicht. Praktisch wird dieser Faltungsvorgang dadurch realisiert, dass eine Lösung, die *scaffold*- und *staple*-DNA enthält, erhitzt und anschließend langsam abgekühlt wird. Dies stellt sicher, dass es zu keinen unerwünschten Verklumpungen durch komplementäre Basenpaarung kommt. Durch geeignete Wahl der *staple*-Sequenzen lässt sich nun nahezu jede beliebige Struktur programmieren, wobei diese natürlich in ihrer Größe durch die Länge des verwendeten *scaffoldes* beschränkt ist.[27] Da zusätzlich jeder *staple*-Strang vor dem Faltungsprozess modifizierbar ist, d.h. ein beliebiges weiteres Molekül kovalent angebunden werden kann, lässt sich ein solches DNA-Origami als nanoskopische Rasterplatte verwenden, auf der beliebige Moleküle auf genau definierten Positionen platziert werden können. Beispielsweise ist es dadurch möglich, zwei Farbstoffmoleküle in einen genau definierten Abstand zueinander zu setzen.[43] Der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Methoden, definierte Nanostrukturen zu erzeugen, ist dabei der extrem hohe Parallelisierungsgrad. So werden mit einem einzigen Ansatz einige Billionen Kopien dieser Struktur erzeugt.

2. Theoretische Grundlagen

2.3.2 Aktinfilamente

Eine der gängigsten Testproben für super-auflösende Mikroskopie-Techniken sind neben den Mikrotubuli die sogenannten Aktinfilamente. Beide sind Teil des eukaryontischen Zytoskeletts. Aktinfilamente bestehen aus zwei spiralförmig umeinander gewundenen Polymeren des Proteins Aktin. Sie weisen in der Regel eine Dicke von 5 bis 7 nm auf. In Zellen ist ihre hauptsächliche Aufgabe neben der Strukturbildung die Mitwirkung an der Zellbewegung, so sind sie beispielsweise ein wichtiger Bestandteil tierischer Muskelzellen. Sowohl für die Kontraktion solcher Muskelzellen als auch für die Durchführung der Schwimmbewegung eukaryontischer Einzeller ist eine Wechselwirkung zwischen Aktinfilamenten und dem Protein Myosin verantwortlich.[1] Die Affinität zu ebendiesem Protein eröffnet die Möglichkeit, Aktinfilamente in vitro auf einer Oberfläche zu fixieren, was die Verwendung außerhalb von Zellen erlaubt und Aktinfilamente somit zu einer einfach zu verwendenden Testprobe für die super-auflösende Mikroskopie macht. Ihre netzartige Struktur auf der Oberfläche oder auch innerhalb einer Zelle sorgt darüberhinaus dafür, dass nahezu jeder beliebige Abstand realisiert wird, wodurch das erzielte Auflösungsvermögen gut evaluiert werden kann.

2.3.3 Fibroblasten

Fibroblasten sind gering spezialisierte Zellen, die sich in jedem Bindegewebe von Säugetieren finden lassen. Die Kultivierung dieses Zelltyps ist vergleichsweise unkompliziert, was unter anderem an ihrem geringen Differenzierungsgrad und der solitären Lebensweise liegt. Eine zeitlich unbegrenzte Kultivierung ist allerdings nicht ohne Weiteres möglich, da Fibroblasten in der Regel nur etwa 50 Teilungszyklen durchführen. In Kultivierung ist adhärentes Wachstum der Regelfall.[44] Abbildung 2.9 zeigt eine typische Fibroblastenzelle.

2. Theoretische Grundlagen

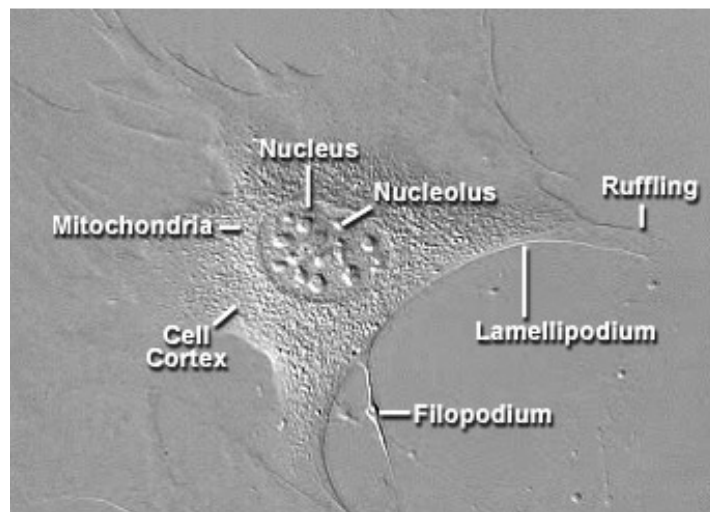


Abbildung 2.9: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Fibroblastenzelle.[45]

Die am häufigsten verwendete Fibroblasten-Zelllinie wurde 1962 aus mäuseembryonalen Hautzellen kultiviert und wird mit der Abkürzung 3T3 bezeichnet. Dies ist ein Akronym, welches sich aus der Art und Weise ableitet, wie diese Zelllinie zu kultivieren ist: Die Zelllinie ist alle **3** Tage umzusetzen (*transfere*d) und dabei in einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ pro 20 cm^2 neu aufzubringen. 3T3-Zellen wachsen ausschließlich in einlagigen Schichten und weisen dabei ein deutlich flacheres Wachstum auf als dies bei anderen Fibroblasten-Zelllinien üblich ist.[46] Dies ist ein großer Vorteil für deren Verwendung als biologische Testprobe für super-auflösende Fluoreszenzmikroskopie und erklärt ihre weite Verbreitung in diesem Gebiet.

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die benötigten Techniken und Materialien vorgestellt. Dabei wird zunächst auf den verwendeten Versuchsaufbau im Detail eingegangen. Desweiteren werden die Verfahren zur Herstellung der untersuchten Proben erläutert.

3.1 Der Versuchsaufbau

In diesem Abschnitt wird nun näher auf den Versuchsaufbau eingegangen. Für alle Messungen wurde ein inverses Mikroskop der Firma Olympus (IX71) benutzt. Die Lichtanregung fand stets über externe Einkopplung statt. Das Fluoreszenzlicht wurde ebenfalls extern detektiert. Dazu wurde eine EMCCD-Kamera der Firma Andor (ixon DU860 oder ixon DU897) verwendet. Der Aufbau ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

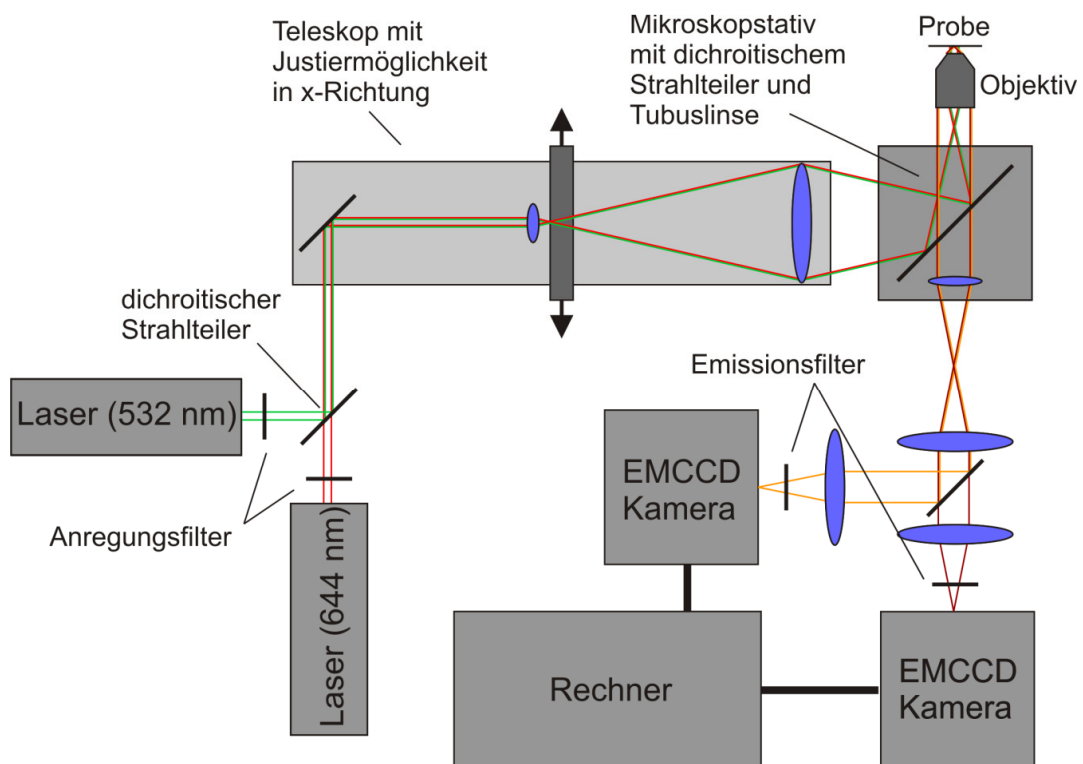


Abbildung 3.1: Schematische Skizze des Versuchsaufbaus

3. Material und Methoden

3.1.1 Der Laser

Die Laseranregung fand vorwiegend in den Wellenlängenbereichen 644 nm (rot) und 532 nm (grün) statt. Als Lichtquellen für die rote Anregung wurden Laser der Firma Toptica (XTL und ibeam smart) verwendet. Die Lichtquellen der grünen Anregung war der VFL-P-1000-532 von MPB Communications.

3.1.2 Der Anregungsstrahlengang

Der Zweck des Anregungsstrahlengangs ist die Erzeugung eines Fokus in der hinteren Brennebene des Objektivs. Dies wurde mithilfe eines Systems aus zwei Linsen realisiert (Abbildung 3.1). Die Brennweite der ersten Linse (das ist die dem Laser am nächsten liegende Linse) ist dabei deutlich kürzer (typisch $f_1 = 12,5 \text{ mm}$) als die der zweiten Linse (typisch $f_2 = 100 \text{ mm}$). Die beiden Linsen stehen in einem Abstand d zueinander, wobei $d = f_1 + 2 \cdot f_2$. Zudem beträgt die Entfernung zwischen der zweiten Linse und der hinteren fokalen Ebene des Objektivs $2 \cdot f_2$. Die Größe der durch diese Anordnung erzeugten ausgeleuchteten Fläche in der Probe hängt von den Brennweiten der beiden Linsen ab. Eine kleine ausgeleuchtete Fläche hat den Vorteil, dass die Intensität bei konstanter Lichtleistung höher wird und somit kürzere Anzustände bei Farbstoffmolekülen generiert werden können. Dagegen bestehen die Vorteile einer größeren ausgeleuchteten Fläche in einer homogenen Ausleuchtung und natürlich einer größeren Anzahl an anregbaren Molekülen im Sichtfeld.

3.1.3 Das Mikroskop

Das Anregungslicht wurde durch den hinteren Eingang des Mikroskops (Olympus IX-71) über einen dichroitischen Strahlteiler (Dualband z532/633, AHF Analysentechnik) in das Objektiv (PlanApoN Öl, 100 fache Vergrößerung, numerische Apertur 1,40, Olympus) eingekoppelt. Das vom Objektiv eingesammelte Licht trifft erneut auf den dichroitischen Strahlteiler, der für das rotverschobene Fluoreszenzlicht durchlässig ist. Über einen Seitenausgang des Mikroskops kann das Licht schließlich in den Detektionsstrahlengang ausgekoppelt werden. Dabei wird es durch eine im Mikroskop fest integrierte Tubuslinse fokussiert, wobei sich die Fokusebene wenige Zentimeter hinter dem verwendeten Seitenausgang befindet.

3. Material und Methoden

3.1.4 Die Technik der totalen internen Reflexion

Speziell in der lokalisierungsbasierten Superauflösungsmikroskopie ist ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis wichtig. Dieses kann durch Verringerung der Hintergrundfluoreszenz verbessert werden. Die Hauptquelle des Hintergrundsignals ist die Fluoreszenz der Lösung, in der sich die Probe befindet. Die vollständige dreidimensionale Durchleuchtung der Lösung mit dem Anregungslaserlicht führt zu einem hohen Fluoreszenzsignal, welches das eigentlich gewünschte Signal überdeckt. Da die untersuchten Proben jedoch in der Regel flache, oberflächennahe Objekte sind, ist es ausreichend, die Illumination auf den oberflächennahen Bereich zu beschränken. Mit oberflächennah ist dabei ein maximaler Abstand zur Glasoberfläche von wenigen hundert Nanometern gemeint. Dies wurde mithilfe der sogenannten TIRF-Methode (*total internal reflection fluorescence*) erreicht.[47] Dabei trifft der Anregungsstrahl nicht senkrecht auf das die Probe tragende Deckglas auf, sondern in einem flachen Winkel dazu. Realisiert wurde das durch das sogenannte Objektiv-Verfahren (im Gegensatz zum Prisma-Verfahren). Dabei wird der Anregungsstrahl nicht zentral auf die hintere fokale Ebene des Objektivs ausgerichtet, sondern lateral dazu versetzt. Erreicht wurde das durch die Verwendung eines xy-Verschiebers (owis) im Anregungsstrahlengang. Auf diese Weise war der Winkel, in dem das Deckglas getroffen wurde, beliebig einstellbar. Für den Fall, dass der eingestellte Winkel kleiner als ein bestimmter kritischer Winkel ist, tritt sogenannte Totalreflexion auf. Der kritische Winkel ist dabei gegeben durch

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_{\text{Lösung}}}{n_{\text{Glas}}}\right) \quad (3.1)$$

Im Fall der Totalreflexion wird das Anregungslicht an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Lösung vollständig reflektiert, wodurch die Lösung nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Direkt über der Grenzfläche bildet sich allerdings eine sogenannte evaneszente Welle aus, also ein elektrisches Feld, dessen Amplitude exponentiell abfällt. Dessen Eindringtiefe ist proportional zur Wellenlänge des verwendeten Lichtes und liegt in der Größenordnung von etwa 100 nm. Die sich direkt auf der Oberfläche befindende Probe wird somit im Gegensatz zur Lösung vollständig angeregt. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird daher deutlich erhöht.

3.1.5 Der Detektionsstrahlengang

Das durch die Tubuslinse fokussierte Licht wurde durch eine weitere Linse ($f = 100 \text{ mm}$) wieder parallelisiert. In diesen parallel verlaufenden Strahlengang konnte nun optional ein

3. Material und Methoden

Strahlteiler eingebracht werden, um einen Teil des Lichtes rechtwinklig auszukoppeln. Der Strahlteiler konnte dabei entweder wellenlängenunabhängig oder dichroitisch sein. Jeder der beiden Strahlengänge (oder in Abwesenheit eines Strahlteilers der eine Strahlengang) wurde schließlich durch je eine weitere Linse ($f = 160 \text{ mm}$) auf die Detektionsfläche einer EMCCD fokussiert.

3.1.6 Die Kamera

Der Detektorschip der verwendeten Kameras (Andor ixon DU-860 oder ixon DU-897) ist eine zweidimensionale Matrix von Photosensoren (Pixeln). Diese sind bei der ixon DU-860 in 128 Zeilen und Spalten angeordnet, wohingegen die ixon DU-897 über 512 Zeilen und Spalten verfügt. Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des Detektorschips. Die Quantenausbeute liegt bei etwa 90 %, wobei jedoch je nach Einstellung des Vorverstärkers zwischen 12 und 15 Photonen benötigt werden, um in einem Pixel ein Elektron herauszulösen. Das Auslesen der herausgeschlagenen Elektronen erfolgt wie bei jeder CCD-Kamera zeilenweise, wobei allerdings die Möglichkeit besteht, über die Frame-Transfer-Technik die aufgesammelten Signale zunächst als Ganzes aus dem Belichtungsbereich in einen gesonderten unbelichteten Auslesebereich zu verschieben.

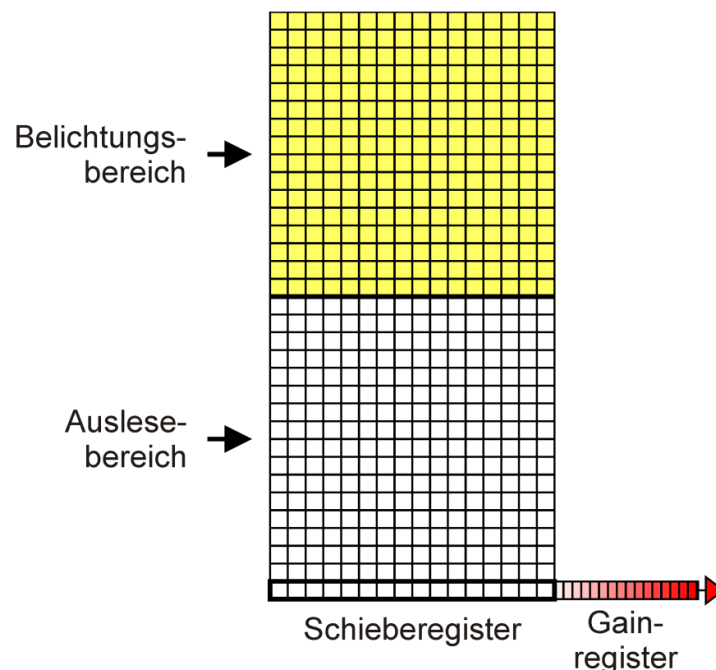


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Detektionsfläche einer EMCCD-Kamera

3. Material und Methoden

Das hat den Vorteil, dass im Belichtungsbereich bereits das nächste Bild aufgenommen werden kann, während das vorhergehende noch im Auslesebereich ausgelesen wird. Die Frame-Transfer-Technik kam in allen in dieser Arbeit vorgestellten Messungen zum Einsatz. Das Signal wird nach dem Auslesen noch durch Elektronenvervielfältigung verstärkt. Der Verstärkungsfaktor ist frei wählbar (bis maximal 1000), wurde jedoch stets (sofern nicht anders angegeben) auf den Wert 250 eingestellt.

3.1.7 Dreidimensionale Mikroskopie

Der Aufbau konnte auf zwei Arten für die dreidimensionale Lokalisierung erweitert werden. Die eine Möglichkeit war, wie in Abschnitt 3.1.5 einen wellenlängenunabhängigen Strahlteiler zu verwenden und damit die Probe simultan auf beide Kameras abzubilden. Dabei wurden die Kameras allerdings so eingestellt, dass die Schärfenebenen der beiden Strahlengänge gegeneinander versetzt waren, sodass aus dem unterschiedlichen Fokussierungsgrad in beiden Bildern eine räumliche Tiefeninformation gewonnen werden konnte.[49, 50] Befand sich beispielsweise ein detektiertes Farbstoffmolekül in einer der Schärfenebenen der Kameras, so wies die PSF des Moleküls auf dieser Kamera ihre minimale (d.h. beugungsbegrenzte) Breite auf, während sie auf der anderen Kamera messbar breiter war. Befand sich das Molekül dagegen in der Mitte zwischen den beiden Schärfenebenen, so waren die PSF-Breiten in beiden Bildern gleich. Die zweite Möglichkeit war die Platzierung einer Zylinderlinse anstelle des Strahlteilers in den Strahlengang.[20] Eine solche Anordnung ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

3. Material und Methoden

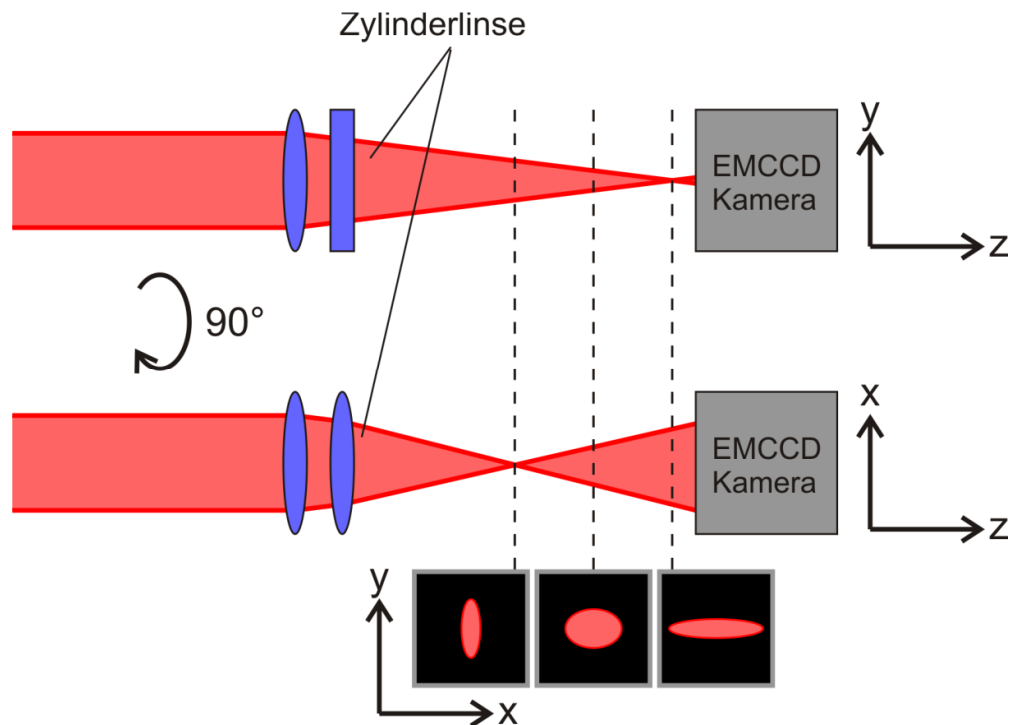


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Astigmatismus-basierten z-Lokalisierung: Aufgrund der Zylinderlinse sind die Brennebenen für beide lateralen Achsen unterschiedlich, wodurch die Form des Punktbildes eine Funktion von z ist.

Die Brennweite der Linse betrug dabei 100 mm, 1000 mm oder 10 m. In diesem Fall wurde die 3d-Information durch eine z-abhängige Verzerrung des Bildes gewonnen. Um aus dem unterschiedlichen Fokussierungsgrad der beiden Bilder bzw. der Verzerrung des einen Bildes auf die z-Position schließen zu können, wurde der Aufbau vor jeder Messung mit Beads (40 nm Transfluor, Invitrogen) kalibriert.

3. Material und Methoden

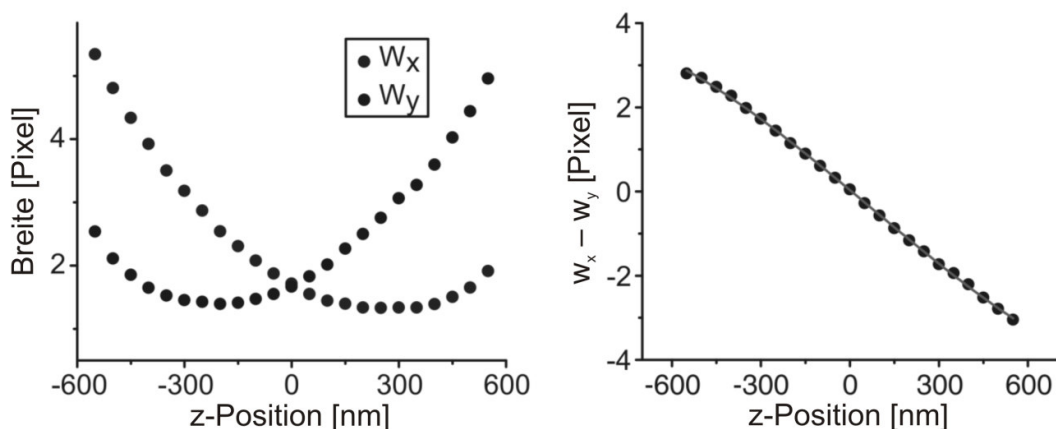


Abbildung 3.4: Kalibrierung eines Astigmatismus-basierten 3d-Mikroskops mit Beads: Unter Variation der z-Position (mithilfe eines Piezo-Motors) wird die Breite der Bead-PSF in beiden lateralen Achsen gemessen (links). Die Differenz beider Werte lässt sich mit einer Polynomfunktion anfiten (rechts).[29]

Die Kalibrierung wurde durchgeführt, indem das Objektiv unter einer Glasoberfläche mit Beads schrittweise mithilfe eines Piezo-Motors in z-Richtung verschoben wurde. Für jede z-Position des Objektivs wurde ein Bild der Bead-Oberfläche aufgenommen. In jedem Bild wurde anschließend die Breite der PSF eines exemplarischen Beads in x- und in y-Richtung mithilfe eines Gauß-Fits vermessen. Die Differenz beider Werte wurde schließlich gegen die z-Position aufgetragen und mit einer Polynomfunktion angepasst. Eine solche Kurve ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die resultierende Polynomfunktion konnte dann verwendet werden um in 3d-Messungen die z-Position von Farbstoffmolekülen zu berechnen.

3.2 Vorbereitung der Proben

Im folgenden Abschnitt wird nun das Vorgehen bei der Vorbereitung der verwendeten Proben näher beschrieben.

3.2.1 BSA-Biotin-Oberflächen

Als Oberfläche wurde in der Regel ein sogenanntes LabTek (Nunc) verwendet. Dieses ist ein 0,17 mm dickes mit acht Kammern versehenes Deckglas. Die Kammern weisen dabei ein Fassungsvermögen von je etwa 700 μ l auf. Die Präparation dieser LabTeks fand nun in

3. Material und Methoden

folgenden Schritten statt: Zunächst wurde die Oberfläche mit 0,1 % Flusssäure (HF) behandelt und 30 Sekunden inkubieren gelassen. Anschließend wurde sie dreimal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen. 3 mg/ml Albumin aus bovinem Serum (BSA) und 0,6 mg/ml Biotin an BSA gebunden wurden in PBS gelöst. Jede LabTek-Kammer wurden nun mit 300 µl dieser Lösung befüllt und entweder über Nacht bei 4 °C oder für drei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Oberfläche erneut dreimalig mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden in jede Kammer 300 µl einer Streptavidin-Lösung (0,1 mg/ml in PBS) gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Ungebundenes Streptavidin wurde danach durch weiteres dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Auf diese Oberflächen konnten nun Biotin-markierte Proben angebunden werden. Abbildung 3.5 stellt die Oberfläche schematisch dar.

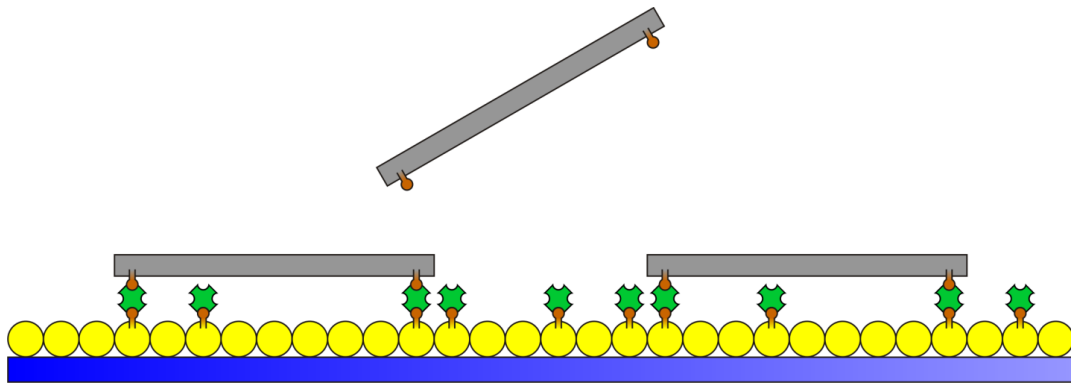


Abbildung 3.5: Schema einer BSA-Biotin-Oberfläche: Auf die durch BSA (gelb) passivierte Oberfläche wird über Biotin (orange) und Streptavidin (grün) die Probe (grau) angebunden.

Die anzubindenden Proben waren entweder einzelne Farbstoffmoleküle, oder DNA-Origami-Strukturen, die in der Regel in einer Konzentration von etwa 100 pM auf die Oberfläche gegeben und nach kurzem Warten wieder herunter gespült wurden. Die optimale Wartezeit betrug dabei für Einzelmoleküle einige Sekunden. DNA-Origami-Strukturen benötigten dagegen deutlich länger für die Anbindung, weshalb die Lösung erst nach einer Zeit von bis zu 30 Minuten gespült wurde. Die Anbindung der DNA-Origami-Strukturen erforderte zudem die Zugabe von MgCl_2 (500 mM), um die repulsive elektrostatische Kraft zwischen Streptavidin und DNA abzuschirmen.

3. Material und Methoden

3.2.2 Aktinfilamente in vitro

Die verwendeten Aktinfilamente wurden zunächst durch Polymerisierung von Aktin-Monomeren (invitrogen) hergestellt. An die dafür verwendeten Aktin-Monomere war jeweils ein Atto655-Molekül gebunden. Die Monomere wurden 5µM in eine Pufferlösung gegeben, die 25 mM Imidazol, 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) und 1 mM Dithiothreitol (DTT) enthielt. Das DTT stellte dabei durch Verhinderung der Oxidation von Sulfohydryl-Gruppen die Funktionsfähigkeit der Proteine sicher, während das EGTA durch Binden von Kalziumionen für eine kalziumarme, d.h. zellenähnliche Umgebung sorgte. Nach fünf Minuten wurde der Lösung zur Stabilisierung der Filamente Phalloidin in einer Endkonzentration von 8 µM zugesetzt. Die Lösung wurde schließlich auf eine mit BSA und Myosin behandelte Glasoberfläche gegeben und nach kurzer Inkubationszeit mit PBS herunter gewaschen. Die Wechselwirkung zwischen Myosin und Aktin führte dazu, dass die Aktinfilamente auf der Oberfläche fixiert wurden. Der Bindungsmechanismus zwischen Myosin und Aktin kommt so beispielsweise in tierischem Muskelgewebe vor. Die Relativbewegung zwischen Aktin und Myosin bewirkt dort die Muskelkontraktion und wird konzentrationsabhängig durch ATP induziert. Um also die gewünschte Unbeweglichkeit der Aktinfilamente auf der Oberfläche zu gewährleisten, musste darauf geachtet werden, dass die Lösung frei von ATP war.[51] Die Länge der Inkubationszeit war dabei Ermessenssache und wurde so eingestellt, dass sich ein ausreichend dichtes Netz aus Aktinfilamenten ergab.

3.2.3 Aktinfilamente in fixierten Zellen

Die Blink-Mikroskopie wurde ferner auch auf das Zytoskelett fixierter Zellen angewandt. Dafür wurde eine Zelllinie des Typs 3T3 kultiviert. Für die Kultivierung wurde eine 50-ml-Kulturflasche verwendet, die mit 5 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gefüllt wurde, welches 10 % N-Chlorsuccinimid als Wachstumsfaktor enthielt. Das Zellwachstum fand bei einer Temperatur von 37 °C unter CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank statt und erforderte eine Umsetzung der Zellen alle drei Tage. Zum Umsetzen wurde zunächst das alte Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für das Ablösen der auf dem Boden der Kulturflasche adhärent wachsenden Zellen wurde sie mit 1 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) überdeckt und fünf Minuten lang in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die von der Oberfläche gelösten Zellen mit 4 ml PBS verdünnt. In eine frische Kulturflasche, die mit 5 ml Medium befüllt worden war, wurden

3. Material und Methoden

schließlich 0,5 ml dieser Zellemulsion gegeben. Wenn die Zellen für Blink-Mikroskopie genutzt werden sollten, wurde zusätzlich ein LabTek verwendet. In diesem Fall wurden pro LabTek-Kammer 400 µl Flüssigkeit aus der frischen Kulturflasche in das LabTek gefüllt. Sowohl die Kulturflasche als auch das LabTek wurden anschließend in den Brutschrank gestellt. Das LabTek wurde nach einer Zeit von ein bis zwei Tagen aus dem Brutschrank entnommen. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (3,7 % in PBS) fixiert. Nach zehn Minuten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe einer Lösung aus 5 % BSA und 0,5 % Triton X-100 in PBS wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, das nun allerdings 0,1 % Tween 20 enthielt. Anschließend wurden die Aktinfilamente angefärbt. Dies geschah durch Zugabe von Phalloidin, welches mit dem Farbstoff Atto655 markiert war.

3.2.4 Aktinfilamente in lebenden Zellen

Für Versuche mit lebenden Zellen wurden ebenfalls Zellen der oben beschriebenen Zelllinie verwendet. Diese wurden wie oben beschreiben auf einem LabTek präpariert, dabei allerdings weder fixiert noch permeabilisiert. Zudem bestand das hierfür verwendete LabTek im Gegensatz zu den anderen Experimenten aus nur einer Kammer. Das markierte Phalloidin wurde mithilfe einer Mikroinjektionsanlage des Typs FemtoJet (Eppendorf), die an dem Mikroskopstativ montiert war, in die lebenden Zellen eingebracht. Die dafür verwendeten Nanopipetten Femtotips kamen ebenfalls von der Firma Eppendorf. Diesen wurden jeweils mit einer 5 µM Lösung von Phalloidin-Atto655 befüllt. Die Injektion der Lösung in eine Zelle fand unter einem Druck von 200 hPa statt, wobei die Injektionszeit bei einer Sekunde lag. Das Fluoreszenzsignal der auf diese Weise gefärbten Zellen wurde anschließend mithilfe der CCD-Kamera detektiert.

3.2.5 Herstellung von DNA-Origami-Strukturen

Die für die DNA-Origami-Herstellung verwendeten Staple-Stränge wurden von den Firmen IBA und MWG bezogen, während als Rückgrat-Strang das Genom des Bakteriophagen M13mp18 verwendet wurde. Bei der Hybridisierung lag die Konzentration des Rückgrat-Stranges bei 3 nM. Die Konzentration der Staple-Stränge wurde so gewählt, dass die unmodifizierten Staple-Stränge einen Überschuss von 30 : 1 gegenüber dem Rückgrat-

3. Material und Methoden

Strang und die modifizierten Staple-Stränge einen von 100 : 1 aufwiesen. Dies war notwendig, um die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Hybridisierung zu erhöhen. Die Hybridisierung wurde in einem Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt. Dabei wurde der Hybridisierungsprozess mit der Aufheizung der Probe auf 95 °C begonnen, um ein Vorliegen aller DNA-Stücke als Einzelstränge sicherzustellen. Diese Temperatur wurde für 30 Sekunden beibehalten. Anschließend wurde die Temperatur langsam heruntergefahren solange bis der Endwert von 5 °C erreicht wurde. Die Abkühlgeschwindigkeit hing dabei von dem verwendeten DNA-Origami ab. So betrug die Gesamtdauer bei zweidimensionalen DNA-Origami-Strukturen in der Regel 90 Minuten und für dreidimensionale Strukturen bis zu drei Tage. Die Aufreinigung, d.h. die Trennung der gefalteten DNA-Origami-Strukturen von den übrig gebliebenen Staple-Strängen wurde durch zwei verschiedene Arten erreicht. Die eine Möglichkeit war die Filterung durch Amicon-Filter ((100kMWCO). Die andere Möglichkeit war die Auftrennung über eine Gelelektrophorese. Zur Herstellung des Gels wurde eine Lösung aus 1,5 % Agarose in 0,5-fachem TAE-Puffer verwendet. Diese wurde zunächst zum Kochen gebracht und anschließend auf etwa 50 °C abgekühlt. Dieser Lösung wurde dann $MgCl_2$ in einer Endkonzentration von 11 mM zugesetzt. Die Lösung wurde schließlich in eine Gelschale (BioRad) gegeben und erkalten lassen. Dabei sorgte ein Gelkamm für das Entstehen von rechteckigen Aussparungen, den sogenannten Gelkammern. Deren Volumen betrug 20 bis 50 μ l. Diese wurden mit 25 μ l der DNA-Origami-Lösung und 5 μ l Ladepuffer befüllt. Die Zusammensetzung des Ladepuffers beinhaltete 30 % Glycerin und 0,025 % Bromphenolblau in Wasser. An das Gel wurde eine Spannung von 70 V angelegt, wobei die befüllten Gelkammern am Minuspol lagen. Üblicherweise bewirkte die angelegte Spannung einen Stromfluss von ungefähr 100 mA, welcher zu einer Wärmeentwicklung im Gel führte. Da DNA-Origami-Strukturen nicht temperaturstabil sind, musste die Gelkammer mit Eis gekühlt werden. Nach einer Laufzeit von üblicherweise 1 bis 2 Stunden konnten schließlich die freien Staple-Stränge und die DNA-Origami-Strukturen in unterschiedliche Banden aufgetrennt werden. Die verschiedenen Banden wurden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dafür wurde das Gel für 45 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μ g / ml) gegeben und anschließend auf einem UV-Tisch die einzelnen Banden sichtbar gemacht. Die Bande, welche die DNA-Origami-Strukturen enthielt, wurde dann mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Extrahiert wurden die DNA-Origami-Strukturen schließlich, indem die ausgeschnittene Bande in ein spezielles Zentrifugen-Röhrchen (Freeze `N Squeeze, BioRad) gegeben wurde. Dieses wurde dann für 5 Minuten bei -20 °C gefroren und anschließend für 3 Minuten bei 13000 g zentrifugiert.

3. Material und Methoden

3.3 Bildgenerierung in der Lokalisierungsmikroskopie

Die Berechnung supraauflösender Bilder aus den Rohdaten wurde mithilfe einer in LabVIEW geschriebenen Software durchgeführt. Die Auswertung bestand dabei in mehreren automatisierten Schritten: Zunächst müssen Spots in den Rohvideos detektiert werden. Dafür wird der Film bildweise Pixel für Pixel durchgegangen. Jedes Pixel wird genau dann markiert, wenn der mittlere Signalwert des Pixels und seiner direkten Umgebung mindestens um einen Faktor c , der sogenannte Kontrastwert größer ist als das mittlere Signal der weiteren Umgebung (Abbildung 3.6).

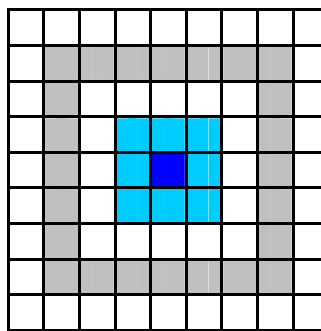


Abbildung 3.6: Schema der Spot-Detektion: Ist der Signalmittelwert der direkten Umgebung (blauer Bereich) mindestens um den vorgegebenen Kontrastwert höher als der Mittelwert der weiteren Umgebung (grauer Bereich), so wird das betreffende Pixel (dunkelblau) markiert.[48]

Dabei ist der Kontrastwert variabel, wurde aber in den meisten Fällen auf den Standardwert $c = 1,4$ eingestellt. Für jede zusammenhängende Menge von markierten Pixeln wird deren Schwerpunkt bestimmt und dann um jeden dieser Schwerpunkte ein 8 mal 8 Pixel großer Bereich ausgeschnitten. In jedem dieser Bereiche wird dann eine zweidimensionale Gauß-Funktion an die Signalwerte angepasst. Aus den daraus gewonnen Zentrumskoordinaten wird schließlich ein zweidimensionales Farbhistogramm, das sogenannte Lokalisierungshistogramm erstellt. Dieses ist identisch mit dem generierten supraaufgelösten Bild. Desweiteren wurde die Möglichkeit implementiert, Intensitätsspuren zu extrahieren, wodurch Blinkkinetiken vermessen werden konnten.[48] Die Programmiersprache LabVIEW wurde ebenso verwendet, um die in dieser Arbeit vorgestellten Simulationen zu implementieren.

4. Ergebnisse und Diskussion

4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden nun die erzielten Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Dabei werden zunächst einige theoretische Überlegungen vorgestellt. Anschließend wird auf die Experimente an Zellstrukturen und DNA-Origamis eingegangen.

4.1 Theoretische Betrachtungen in der Superauflösungsmikroskopie

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene theoretische Betrachtungen zur Superauflösung angestellt. Diese beziehen sich sowohl auf lokalisierungsbasierte Superauflösung, als auch auf STED-Mikroskopie

4.1.1 Kombination der STED-Mikroskopie mit ROXS

Ein kritischer Wert in der STED-Mikroskopie ist die Stabilität des verwendeten Farbstoffs. Dieser limitiert das Auflösungsvermögen der Methode. Durch die Anwendung von ROXS lässt sich somit die Auflösung der Technik erheblich steigern. Dies wurde in Kooperation mit der Universität Bielefeld von der Arbeitsgruppe Sauer systematisch untersucht, indem STED auf eine Einzelmoleküloberfläche angewandt und die Auflösung dadurch bestimmt wurde, dass die Breite der effektiven PSF vermessen wurde.[52] Dabei zeigte sich für hohe STED-Intensitäten, eine signifikante Abweichung der gemessenen Auflösung von der theoretisch erwarteten Auflösung. Die Messwerte sind in Abbildung 4.1 aufgetragen.

4. Ergebnisse und Diskussion

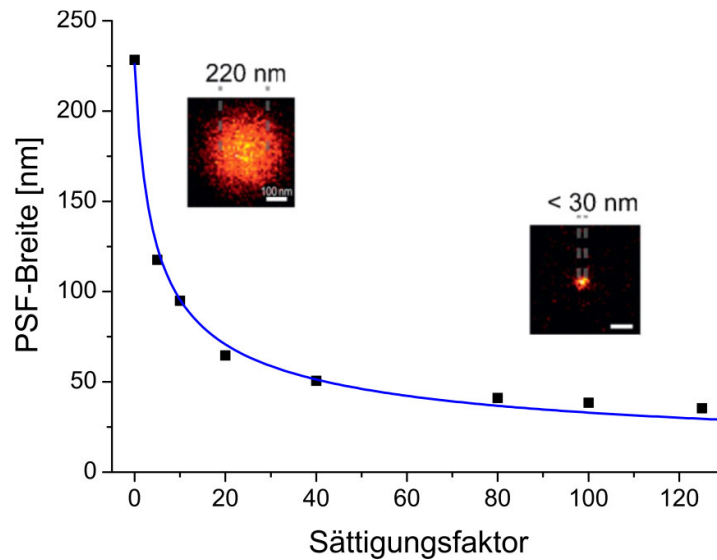


Abbildung 4.1: Gemessene (schwarz) und theoretische (blau) PSF-Breite gegen die normierte STED-Intensität (Sättigungsfaktor).[52]

Dies galt es nun zu erklären. Die vermutete Ursache für diesen Effekt war die Tatsache, dass die Farbstoffmoleküle nicht exakt fixiert waren sondern über eine rotierbare DNA-Verbindung an die Oberfläche gebunden waren. Diese Beweglichkeit sollte zu einer effektiven Verbreiterung der PSF führen. Weiterhin wurde der DNA-Strang als starr angenommen (da dessen Länge deutlich kürzer als die Persistenzlänge von doppelsträngiger DNA von etwa 50 nm war)[53], d.h. dass dieser sich zwar um den Anbindungspunkt drehen, sich aber nicht biegen kann. Das Farbstoffmolekül sollte sich somit frei auf einer Halbkugel um den Anbindungspunkt bewegen können. Ferner wurde angenommen, dass sich der DNA-Strang mit dem Farbstoffmolekül der Oberfläche aus sterischen Gründen nur bis zu einem gewissen Grenzwinkel nähern konnte. Der Bewegungsraum wurde somit von einer Halbkugel auf eine Kugelkalotte reduziert. Schematisch ist dieses Modell in Abbildung 4.2 veranschaulicht.

4. Ergebnisse und Diskussion

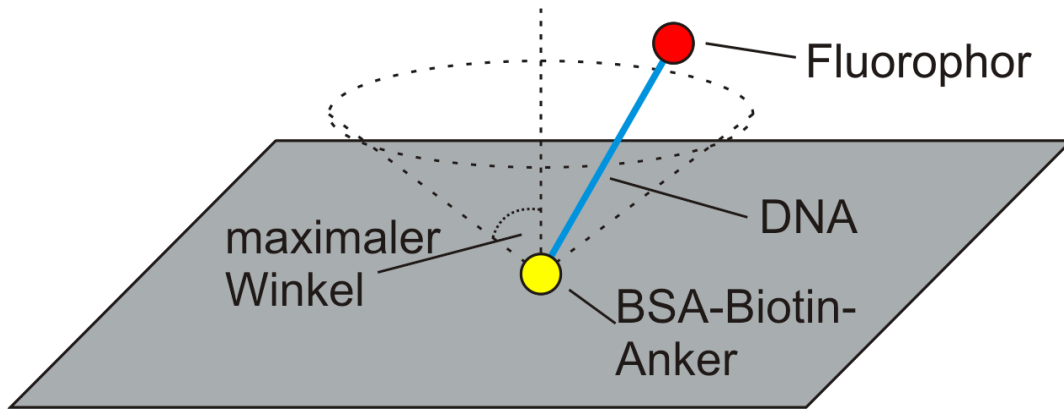


Abbildung 4.2: Schema der Anbindung und Rotierbarkeit eines fluoreszierenden Einzelmoleküls[52]

Schließlich wurde noch angenommen, dass diese Bewegung deutlich schneller abläuft als die Aufnahmezeit der Kamera und zudem vollkommen zufällig ist. Damit kann vorausgesetzt werden, dass das Farbstoffmolekül während eines Aufnahmezyklus jede beliebige Position auf der Kugelkalotte annimmt. Die Aufenthaltsdichtefunktion kann nun wie folgt berechnet werden: Die Dichtefunktion ν des Winkels θ ist proportional zur Länge der entsprechenden Kreislinie und damit auch proportional zum Radius r .

$$\nu(\theta) \propto r \quad (4.1)$$

Da θ eine Funktion von r ist, ist der Aufenthalt in einem bestimmten Winkelintervall $d\theta$ äquivalent mit dem Aufenthalt in dem korrespondierenden Radiusintervall dr . Somit sind auch die entsprechenden Aufenthaltswahrscheinlichkeiten identisch. Es gilt also:

$$\nu(\theta)d\theta = \nu(r)dr \quad (4.2)$$

Somit lässt sich durch Umstellen ein Ausdruck für die Dichtefunktion des Radius erhalten:

$$\nu(r) = \nu(\theta) \frac{d\theta}{dr} \quad (4.3)$$

Der Zusammenhang zwischen θ und r ist gegeben durch

$$\cos(\theta) = \frac{r}{R} \quad (4.4)$$

Dabei steht R für die feste Länge des DNA-Stranges. Damit lässt sich nun $\nu(r)$ berechnen:

$$\nu(r) \propto r \frac{d}{dr} \arccos\left(\frac{r}{R}\right) = \frac{r}{\sqrt{1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2}} \quad (4.5)$$

Wird zusätzlich berücksichtigt, dass θ nur Werte bis zu einem bestimmten Grenzwinkel θ_{max} annehmen kann und somit auch r durch einen Maximalradius r_{max} begrenzt ist, ergibt sich

4. Ergebnisse und Diskussion

$$v(r) = \begin{cases} \alpha \frac{r}{\sqrt{1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2}} & r \leq r_{\max} \\ 0 & r > r_{\max} \end{cases} \quad (4.6)$$

Dabei ist α ein Proportionalitätsfaktor, dessen Wert von R und r_{\max} abhängt. Durch Faltung der PSF mit eben dieser Verteilungsfunktion ergibt sich nun die korrigierte PSF.

$$PSF'(r) = PSF(r) \otimes v(r) = \mathcal{F}(\mathcal{F}(PSF(r)) \cdot \mathcal{F}(v(r))) \quad (4.7)$$

Dabei wurde die PSF vereinfacht als Gauß-Funktion betrachtet. Die Breite der korrigierten PSF konnte schließlich mithilfe eines Gauß-Fits ermittelt werden. Der Zusammenhang zwischen der relativen PSF-Verbreiterung und der Breite der unkorrigierten PSF bzw. des maximalen Winkels ist in Abbildung 4.3 bzw. Abbildung 4.4 dargestellt.

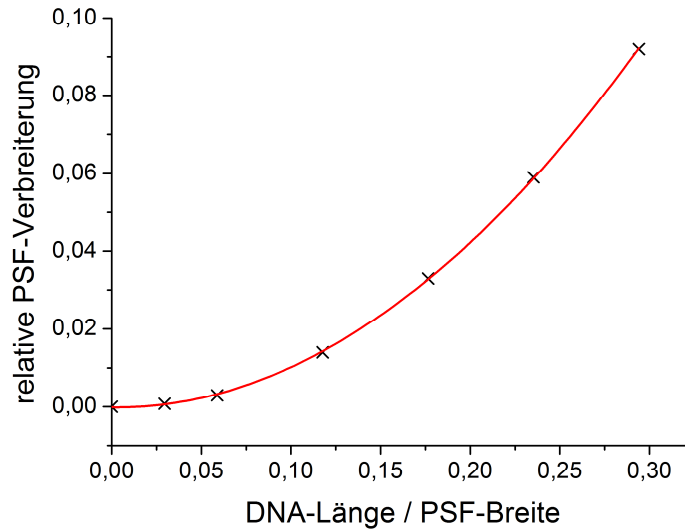


Abbildung 4.3: Abhängigkeit der PSF-Verbreiterung von dem Verhältnis aus Linker-Länge und ursprünglicher PSF-Breite für einen maximalen Winkel von 90°

4. Ergebnisse und Diskussion

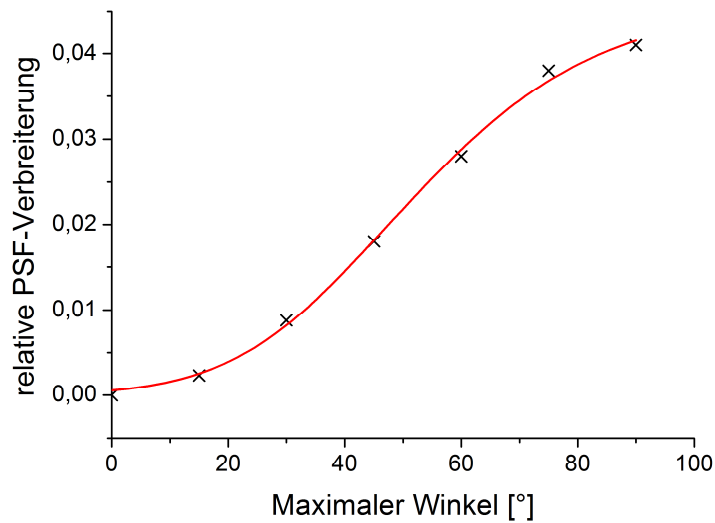


Abbildung 4.4: Abhängigkeit der PSF-Verbreiterung vom maximalen Winkel

Auf die gemessenen Werte[52] angewendet ergab sich folgendes:

Breite der PSF gemäß STED-Gleichung	Theoretische Breite der korrigierten PSF für $\Theta_{\max} = 52^\circ$	Breite der gemessenen PSF	Theoretische Breite der korrigierten PSF für $\Theta_{\max} = 53^\circ$
25,5 nm	35,0 nm	35,2 nm	35,3 nm
30,3 nm	38,0 nm	38,2 nm	38,3 nm

Die Daten waren somit konsistent mit der Theorie, wenn ein Grenzwinkel angenommen wurde, dessen Wert zwischen 52° und 53° liegt.

4.1.2 Optimierung der Integrationszeit in der Blink-Mikroskopie

Ein im Prinzip frei einstellbarer Parameter in lokalisierungsbasierter Mikroskopie ist die Integrationszeit der verwendeten Kamera. Gemäß der üblichen Faustregel wird diese normalerweise so eingestellt, dass sie in etwa dem Erwartungswert der Anzeit der verwendeten blinkenden Emitter entspricht. Im Folgenden wird dieses Verfahren im

4. Ergebnisse und Diskussion

Bezug auf die Optimierung der Lokalisierungsgenauigkeit überprüft. Die Lokalisierungsgenauigkeit ist allgemein gegeben durch

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (4.8)$$

Dabei bezeichnet s die Standardabweichung der PSF, a die Kantenlänge eines Kamerapixels, N die Anzahl der der Lokalisierung zugrunde liegenden Photonen und b das Hintergrundrauschen.[40] Dabei hängt sowohl N als auch b von der Länge der Integrationszeit, die im Folgenden mit t bezeichnet wird, ab. Zunächst soll die Abhängigkeit der Photonenzahl N untersucht werden. Für eine gegebene Integrationszeit t und Anzeit τ_{on} kann die mittlere Zahl detektierter Photonen berechnet werden. Dafür sind zunächst zwei Fälle zu unterscheiden. Für den Fall, dass die Integrationszeit kleiner als die Anzeit ist, ergibt sich:

$$\langle N \rangle_{t < \tau_{on}} = \frac{t \cdot \frac{1}{2} \gamma t + (\tau_{on} - t) \cdot \gamma t + t \cdot \frac{1}{2} \gamma t}{\tau_{on} + t} = \gamma \frac{\tau_{on} \cdot t}{\tau_{on} + t} \quad (4.9)$$

Dabei ist γ die Photonenemissionsrate. Der Fall, dass die Integrationszeit größer als die Anzeit ist, liefert:

$$\langle N \rangle_{t > \tau_{on}} = \frac{\tau_{on} \cdot \frac{1}{2} \gamma \tau_{on} + (t - \tau_{on}) \cdot \gamma \tau_{on} + \tau_{on} \cdot \frac{1}{2} \gamma \tau_{on}}{t + \tau_{on}} = \gamma \frac{\tau_{on} \cdot t}{\tau_{on} + t} \quad (4.10)$$

In beiden Fällen wird dasselbe Ergebnis erhalten. Dadurch lassen sich diese zusammenfassen zu:

$$\langle N \rangle_{\tau_{on}} = \gamma \frac{\tau_{on} \cdot t}{\tau_{on} + t} \quad (4.11)$$

Die Länge der Anzeiten ist exponentiell verteilt, d.h. sie genügen der Verteilungsfunktion

$$v(\tau_{on}) = \frac{1}{\langle \tau_{on} \rangle} e^{-\frac{\tau_{on}}{\langle \tau_{on} \rangle}} \quad (4.12)$$

Damit kann die mittlere Anzahl an detektierten Photonen durch Integration über alle möglichen Werte für die Anzeit bestimmt werden:

$$\begin{aligned} \langle N_{frame} \rangle &= \int_0^\infty \langle N \rangle_{\tau_{on}} v(\tau_{on}) d\tau_{on} = \int_0^\infty \gamma \frac{\tau_{on} \cdot t}{\tau_{on} + t} \frac{1}{\langle \tau_{on} \rangle} e^{-\frac{\tau_{on}}{\langle \tau_{on} \rangle}} d\tau_{on} \\ &= \frac{\gamma t}{\langle \tau_{on} \rangle} \int_0^\infty \frac{\tau_{on}}{\tau_{on} + t} e^{-\frac{\tau_{on}}{\langle \tau_{on} \rangle}} d\tau_{on} \end{aligned} \quad (4.13)$$

Durch eine Substitution mit $x = \tau_{on} + t$ kann das Integral in zwei Summanden aufgeteilt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

$$\langle N_{frame} \rangle = \frac{\gamma t}{\langle \tau_{on} \rangle} \int_t^{\infty} \frac{x-t}{x} e^{-\frac{x-t}{\langle \tau_{on} \rangle}} dx = \frac{\gamma t}{\langle \tau_{on} \rangle} \left(\int_t^{\infty} e^{-\frac{x-t}{\langle \tau_{on} \rangle}} dx - \int_t^{\infty} \frac{t}{x} e^{-\frac{x-t}{\langle \tau_{on} \rangle}} dx \right) \quad (4.14)$$

Das erste Integral kann einfach gelöst werden, sodass sich ergibt

$$\langle N_{frame} \rangle = \frac{\gamma t}{\langle \tau_{on} \rangle} \left(\langle \tau_{on} \rangle - e^{-\frac{t}{\langle \tau_{on} \rangle}} t \int_t^{\infty} \frac{1}{x} e^{-\frac{x-t}{\langle \tau_{on} \rangle}} dx \right) \quad (4.15)$$

Um nun das verbliebene Integral zu vereinfachen wird nun eine Substitution mit $\xi = x/\langle \tau_{on} \rangle$ durchgeführt

$$\begin{aligned} \langle N_{frame} \rangle &= \frac{\gamma t}{\langle \tau_{on} \rangle} \left(\langle \tau_{on} \rangle - e^{-\frac{t}{\langle \tau_{on} \rangle}} t \int_{t/\langle \tau_{on} \rangle}^{\infty} \frac{1}{\xi \langle \tau_{on} \rangle} e^{-\xi} \langle \tau_{on} \rangle d\xi \right) \\ &= \gamma t \left(1 - e^{-\frac{t}{\langle \tau_{on} \rangle}} \frac{t}{\langle \tau_{on} \rangle} \int_{t/\langle \tau_{on} \rangle}^{\infty} \frac{1}{\xi} e^{-\xi} d\xi \right) \end{aligned} \quad (4.16)$$

Dieses Integral wird durch die Exponential-Integral-Funktion $E_1(\xi)$ gelöst.

$$\langle N_{frame} \rangle = N_{on} \varepsilon (1 - \varepsilon e^{\varepsilon} E_1(\varepsilon)) \quad (4.17)$$

Dabei sind $N_{on} = \gamma \langle \tau_{on} \rangle$ und $\varepsilon = t/\langle \tau_{on} \rangle$

Wird der Quotient aus N_{frame} und N_{on} gegen ε aufgetragen ergibt sich der in Abbildung 4.5 dargestellte Graph.

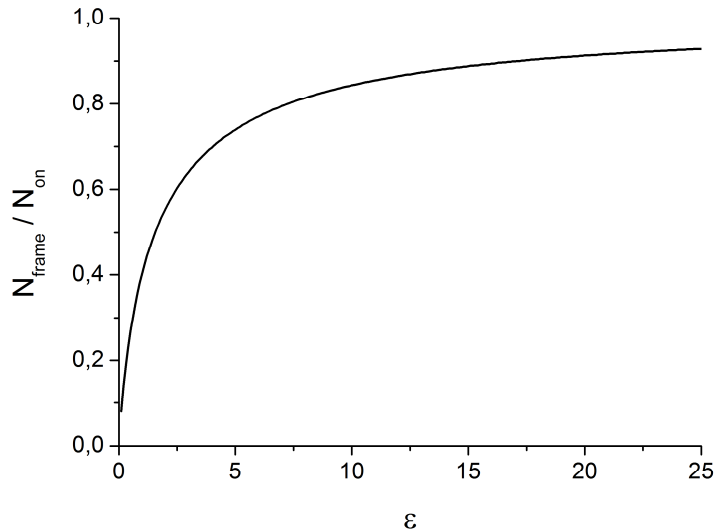


Abbildung 4.5: Abhängigkeit der Photonenzahl von dem Verhältnis aus Integrationszeit und mittlerer Anzeit[54]

4. Ergebnisse und Diskussion

Die zweite wichtige Größe, die die Auflösung bestimmt, ist das Hintergrundrauschen. Das Hintergrundsignal hängt linear von der Integrationszeit ab und ist gegeben durch

$$B = \beta \cdot t \quad (4.18)$$

Dabei ist β die Photonenemissionsrate des Hintergrundes. Die Höhe des Rauschens ergibt sich daraus somit zu

$$b = \sqrt{B} = \sqrt{\beta t} \quad (4.19)$$

Da β genau wie γ proportional zur Anregungsleistung ist, kann β mithilfe eines Proportionalitätsfaktors c auch geschrieben werden als

$$\beta = c \cdot \gamma \quad (4.20)$$

Damit ergibt sich das Hintergrundrauschen als Funktion von ε

$$b = \sqrt{\beta t} = \sqrt{c \gamma t} = \sqrt{c \frac{N_{on}}{\langle \tau_{on} \rangle} t} = \sqrt{c N_{on} \varepsilon} \quad (4.21)$$

Damit kann die Lokalisierungsgenauigkeit als Funktion von ε geschrieben werden:

$$\begin{aligned} \langle (\Delta x)^2 \rangle &= \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \\ &= \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N_{on} \varepsilon (1 - \varepsilon e^\varepsilon E_1(\varepsilon))} + \frac{8\pi s^4 c}{a^2 N_{on} \varepsilon (1 - \varepsilon e^\varepsilon E_1(\varepsilon))^2} \end{aligned} \quad (4.22)$$

Diese Funktion weist ein Minimum auf, dessen Position von c abhängt, jedoch immer größer 1 ist (Abbildung 4.6).

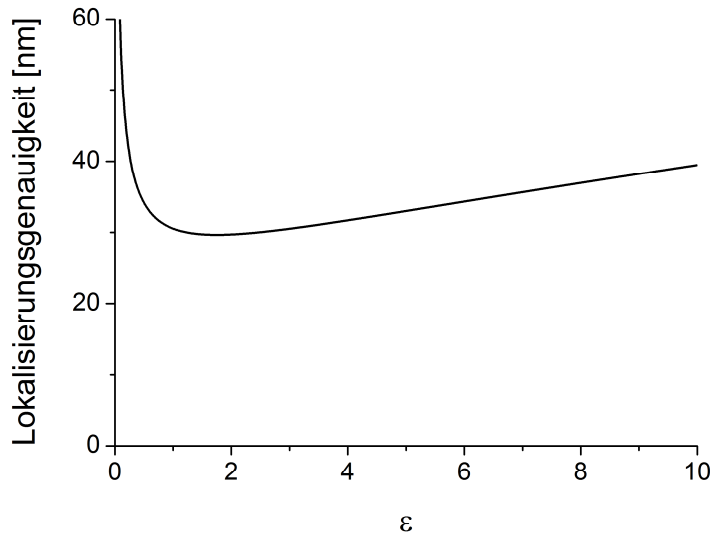


Abbildung 4.6: Abhängigkeit der Lokalisierungsgenauigkeit von dem Verhältnis aus Integrationszeit und mittlerer Anzeit[54]

4. Ergebnisse und Diskussion

Anschließend wurde versucht, diesen Zusammenhang experimentell zu bestätigen. Dafür wurde die Lokalisierungsgenauigkeit auf einer Einzelmoleküloberfläche vermessen, wobei als Farbstoff Atto655 verwendet wurde. Die Pufferumgebung enthielt 10 μM Ascorbinsäure und 100 μM Methylviologen. Desweiteren wurden der Sauerstoff entzogen. Die mittlere Anzeit betrug unter diesen Bedingungen stets 20 ms, während die Integrationszeit zwischen 5 ms und 100 ms variiert wurde. Die Messergebnisse sind in Abbildung 4.7 zusammengetragen.

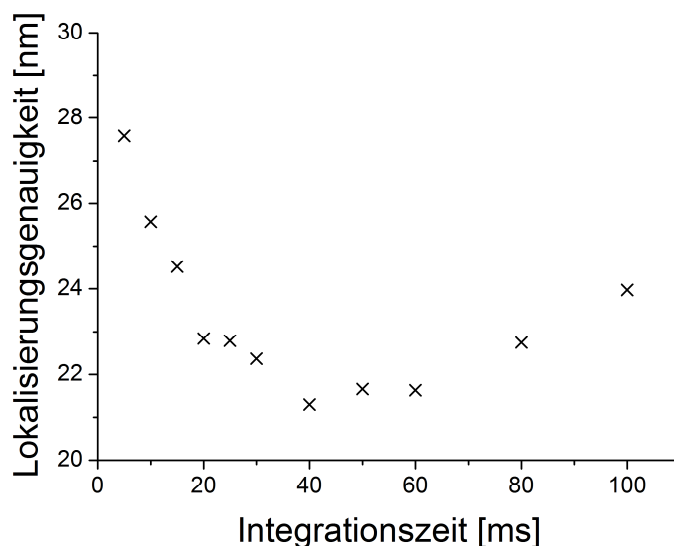


Abbildung 4.7: Abhängigkeit der gemessene Lokalisierungsgenauigkeit von der eingestellten Integrationszeit

Die Messungen zeigen qualitativ dieselbe Abhängigkeit der Lokalisierungsgenauigkeit von der Integrationszeit wie die Theorie. In beiden Fällen gibt es ein Optimum, das erreicht wird, wenn die Integrationszeit nicht der mittleren Anzeit entspricht, sondern signifikant (etwa um den Faktor 2) größer ist. Für die praktische Anwendung zur Optimierung von lokalisierungsbasierter Superauflösungs-Mikroskopie muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass mit diesem Verfahren zwar die Lokalisierungsgenauigkeit optimiert, die effektive Blinkkinetik unter Umständen jedoch verschlechtert wird. Das liegt daran, dass bei zu langer Integrationszeit zwei Farbstoffmoleküle, die zwar theoretisch zeitlich separiert leuchten, effektiv dennoch gleichzeitig emittieren können, falls beide Anzeiten in denselben Frame fallen. Aus diesem Grund muss bei der Erhöhung der Integrationszeit zur Lokalisierungsverbesserung immer beachtet werden, dass das Auszeit-Anzeit-Verhältnis bzw. Auszeit-Integrationszeit-Verhältnis einen ausreichend hohen Wert hat.[54]

4. Ergebnisse und Diskussion

4.2 Superauflösung an Filamenten des Zytoskeletts

Im Folgenden werden nun einige Experimente und deren Ergebnisse vorgestellt. Zunächst wird die Fähigkeit der Blink-Mikroskopie, superaufgelöste Bilder zu generieren, demonstriert. Das für diesen Zweck am häufigsten verwendete Verfahren stellt die Vermessung von zellulären Skelettstrukturen dar. Dabei werden Elemente des Zytoskeletts, wie zum Beispiel Aktinfilamente oder Mikrotubuli mit fluoreszierenden Molekülen markiert und schließlich auf dem zu testenden superauflösenden Aufbau abgebildet.

4.2.1 Aktinfilamente In vitro

Der einfachste Fall, dies zu tun besteht darin, die zellulären Filamente außerhalb der Zelle zu betrachten. Das hat den Vorteil, dass die Präparation deutlich weniger aufwändig ist. Außerdem ist der Hintergrund deutlich vermindert, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Realisiert wurde das durch in-vitro-Polymerisierung und anschließender Immobilisierung auf einer Glasoberfläche, die zuvor mit Myosin belegt wurde. Durch die Überlagerung der einzelnen Aktinfilamente bildete sich eine netzartige Struktur aus. In dieser unregelmäßigen netzartigen Struktur findet sich ein breites Spektrum an Abständen und somit sind auch immer solche Abstände vertreten, die geeignet sind, das Auflösungsvermögen der zu untersuchenden Super-Auflösungsmethode zu überprüfen, d.h. dass sie in der Größenordnung des zu erwartenden Auflösungsvermögens liegen. Um sicherzustellen, dass solche gewünschten Abstände auch in den aufgenommenen Bildern auftraten, wurde eine Messreihe mit insgesamt 30 Aufnahmen durchgeführt. Dafür wurde die Oberfläche mit den darauf immobilisierten Aktinfilamenten (markiert mit ATTO655) zunächst auf Blink-Mikroskopie-Bedingungen gebracht, d.h. es wurde der Sauerstoff entzogen und die Redoxmittel Ascorbinsäure und Methylviologen in einer Konzentration von jeweils 100 μM zugesetzt. Die Intensität der Laseranregung (644 nm) betrug $< 1 \text{ kW} / \text{cm}^2$ für die Suche nach geeigneten Regionen auf der Oberfläche und die Fokussierung. Für die tatsächliche Messung wurde die Intensität jedoch auf $50 \text{ kW} / \text{cm}^2$ erhöht. Ein Kamerapixel entsprach dabei einem quadratischen Probenbereich mit einer Kantenlänge von 78 nm. Für jedes Bild wurden 8000 Frames aufgenommen, wobei die Integrationszeit jeweils auf 2 ms eingestellt wurde. Somit betrug die Gesamtaufnahmezeit je Bild 16 Sekunden. Wie erwartet, wiesen die aus den Lokalisierungen rekonstruierten Bilder eine deutlich höhere Auflösung auf als die Rohbilder. Eine Beispielaufnahme ist in Abbildung 4.8 gezeigt. Um

4. Ergebnisse und Diskussion

das Auflösungsvermögen genauer zu quantifizieren, wurde folgendes gemacht: Die super-aufgelösten Bilder wurden nach Bereichen durchsucht, in denen sich Filamente in paralleler Anordnung befanden, wobei die Filamente optisch trennbar sein mussten. Wurde ein solcher Bereich gefunden, so wurde er rechteckig parallel zu den Filamenten ausgeschnitten.

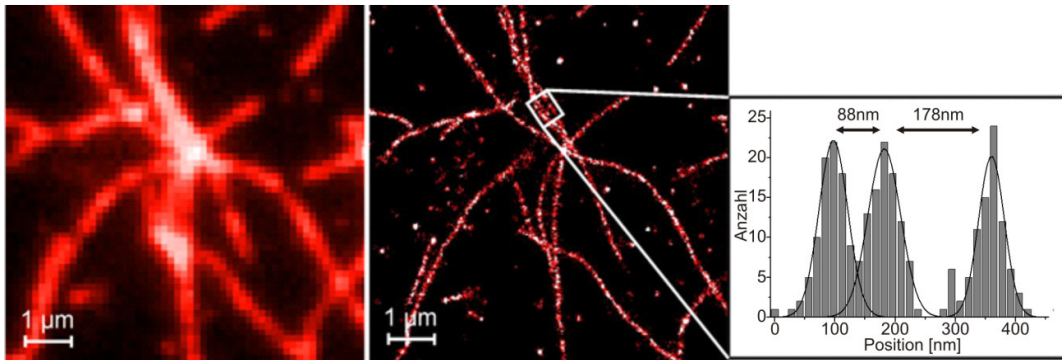


Abbildung 4.8: Aktinfilamente in vitro: Konventionelle Weitfeld-Abbildung (links), supraauflösende Blink-Mikroskopie-Abbildung (Mitte) und Zeilenhistogramm über drei parallele Filamente (rechts)[25]

Alle Lokalisierungen innerhalb des Rechteckes, wurden auf die Rechteckseite, die senkrecht auf den Filamenten steht projiziert und diese Verteilung anschließend histogrammiert. Jedes Filament erzeugte somit ein lokales Maximum in einem solchen Histogramm. Diese Maxima wurden jeweils mit Gauß-Funktionen angenähert, wodurch deren Positionen und speziell deren Abstände von einander bestimmt werden konnten. Der kürzeste auf diese Weise gefundene Abstand betrug 88 nm. Somit konnte damit gezeigt werden, dass die Methode der Blink-Mikroskopie unter diesen Bedingungen in der Lage ist, eine Auflösung von rund 90 nm zu erzielen. Um die allgemeinere Anwendbarkeit des Farbstoffs ATTO655 zu demonstrieren, wurde derselbe Versuch auch ohne Sauerstoffentzug unternommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

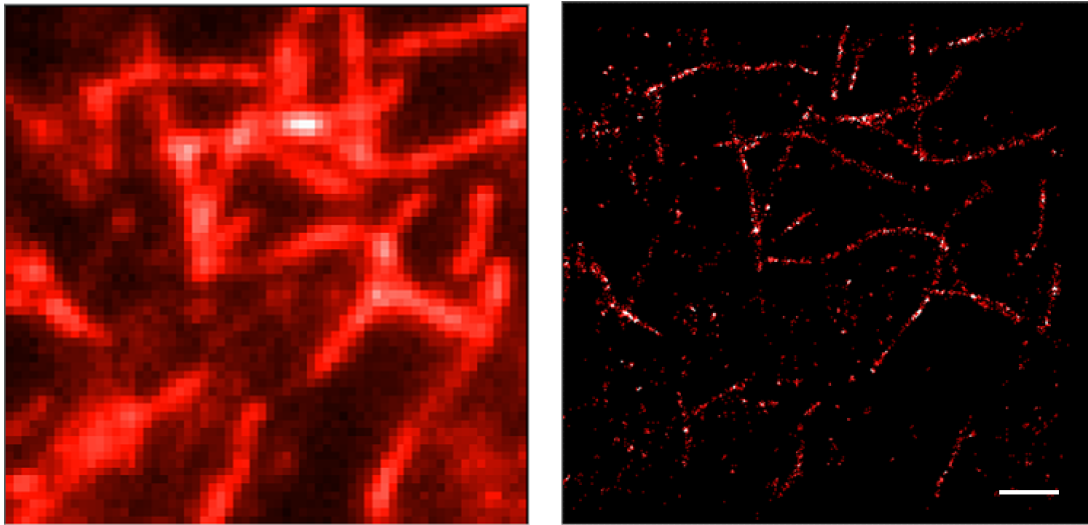


Abbildung 4.9: Aktinfilamente in vitro unter Sauerstoff: Konventionelle Weitfeld-Abbildung (links) und supraauflösende Blink-Mikroskopie-Abbildung (rechts). Der Maßstab beträgt 1,0 μm . [25]

Die dabei erzeugten Bilder wiesen wie zu erwarten war eine deutlich geringere Bildqualität auf, was hauptsächlich an der sauerstoffbedingten geringeren Photostabilität lag (Abbildung 4.9). Diese führte zu einer geringeren Zahl an Lokalisierungen und somit zu einem höheren Bildrauschen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die dabei erzielte Auflösung höher als beugungslimitiert ist. [25]

4.2.2 Aktinfilamente in fixierten Zellen

Immobilisierte Aktinfilamente stellen ein stark vereinfachtes Modellsystem für die Anwendung der Super-Auflösungs-Mikroskopie dar, da es eine geringe biologische Aussagekraft hat. Deshalb wurde ein Modell gewählt, welches eine Ebene komplexer ist. Die in vitro immobilisierten Filamente wurden nun durch natürlich vorkommende Aktinfilamente ersetzt. Dafür wurde das Zytoskelett von eukaryontischen Zellen des Typs 3T3 verwendet. Diese Zellen wiesen den Vorteil einer verhältnismäßig einfachen Kultivierung und einer adhärenenten Wachstumsweise auf. [46] Das adhärenente Wachstum führte zu einer relativ flachen Zellform, wodurch der Großteil des Zytoskeletts unmittelbar auf der Oberfläche lokalisiert ist. Auf diese Weise wird die Illumination in TIRF-Konfiguration ermöglicht, wodurch ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wird. Vor den Messungen mussten die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Anschließend konnten die Aktinfilamente analog zu den in vitro immobilisierten mit Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden. Ebenso konnten die Bedingungen für das

4. Ergebnisse und Diskussion

Blinken der Farbstoffmoleküle eingestellt werden. Dafür wurde ebenfalls enzymatisch der Sauerstoff entfernt. Die Konzentration der Redox-Zusätze wurde wie folgt variiert. Die Konzentration der Ascorbinsäure betrug hier 500 μM und die des Methylviologen betrug 25 μM . Diese Anpassungen waren erforderlich, da die Farbstoffdichte im Vergleich mit der Probe *in vitro* deutlich erhöht war. Die höhere Ascorbinsäure-Konzentration führte zu kürzeren Anzeiten, während die niedrigere Methylviologen-Konzentration längere Auszeiten bewirkte. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass trotz der hohen Farbstoffdichte nicht zu oft Doppellokalisierungen auftraten.

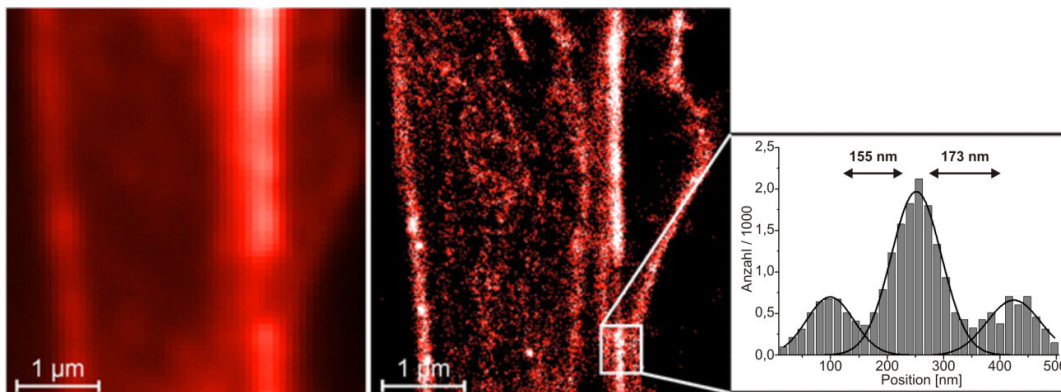


Abbildung 4.10: Aktinfilamente in einer fixierten 3T3-Zelle: Konventionelle Weitfeld-Abbildung (links), supraauflösende Blink-Mikroskopie-Abbildung (Mitte) und Zeilenhistogramm über drei parallele Filamente (rechts)[25]

Analog zum Vorgehen bei der *In-vitro*-Probe wurden die Bilder nach Bereichen parallel liegender Filamente durchsucht und deren Abstände bestimmt. Ein Beispielbild ist in Abbildung 4.10 gezeigt. Der kürzeste aufzulösende Abstand betrug hierbei 155 nm. Die erzielbare Auflösung ist somit signifikant schlechter als bei der *in-vitro*-Probe. Dies hat verschiedene Ursachen. Zum einen weist die Hintergrundfluoreszenz einen deutlich höheren Wert auf, was darauf zurückzuführen ist, dass es in diesen Zellen eine Vielzahl an fluoreszierenden Molekülen vorhanden ist. Dies wird auch als zelluläre Autofluoreszenz bezeichnet, die zwar deutlich dunkler als die der zugegebenen Fluorophore ist, dennoch aber den Hintergrund deutlich erhöht. Desweiteren mussten wie oben erwähnt aufgrund der höheren Emitterdichte die Pufferbedingungen angepasst werden. Die dafür erforderliche höhere Ascorbinsäurekonzentration führt jedoch durch direkte Singulettlöschung dazu, dass die Anzahl der pro Anzeit emittierten Photonen zurückgeht, und die Fluorophore somit dunkler werden. Diese beiden Effekte erniedrigen das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich und führen somit zu einer deutlich reduzierten

4. Ergebnisse und Diskussion

Lokalisierungsgenauigkeit. Zudem sind auch der Einstellung der Blink-Bedingungen Grenzen gesetzt, sodass es trotz der Anpassung häufiger zu unerwünschten Doppellokalisierungen kommen kann. Dennoch ist auch in diesem Fall die Auflösung gegenüber der beugungsbegrenzten Aufnahme sichtbar erhöht.[25]

4.2.3 Aktinfilamente in lebenden Zellen

Das nächst-komplexere biologische System stellt die lebende Zelle dar. Die Technik der Blink-Mikroskopie sollte nun auch auf dieses System angewandt werden. Die dafür verwendeten Zellen wurden derselben Zelllinie entnommen, die bereits für die im vorigen Abschnitt beschriebenen Experimente verwendet wurde. Da lebende Zellen über eine intakte Zellmembran verfügen, stellte sich zunächst das Problem, die Farbstoffmoleküle an die gewünschte Zielstruktur, also die Aktinfilamente, zu bringen. Das Problem wurde durch die Verwendung einer Mikroinjektionsanlage gelöst, mit deren Hilfe Moleküle durch die Membran in die Zelle injiziert werden konnten. Desweiteren gab es keine Möglichkeit, die Pufferbedingungen anzupassen. Stattdessen musste alleine die natürliche zellinnere Umgebung für die Erzeugung von An- und Auszuständen sorgen. Diese ist durch das Vorhandensein von Gluthation zwar leicht reduzierend, enthält allerdings gelösten Sauerstoff. Als Farbstoff wurde daher ebenfalls ATTO655 gewählt, da für diesen bereits gezeigt werden konnte, dass dieser auch unter der Anwesenheit von Sauerstoff Blinkverhalten aufweist.[25] Tatsächlich zeigte der Farbstoff auch in der lebenden Zelle Auszustände. Eine solche Zelle mit blinkenden Farbstoffmolekülen und der dazugehörigen Intensitätsspur ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

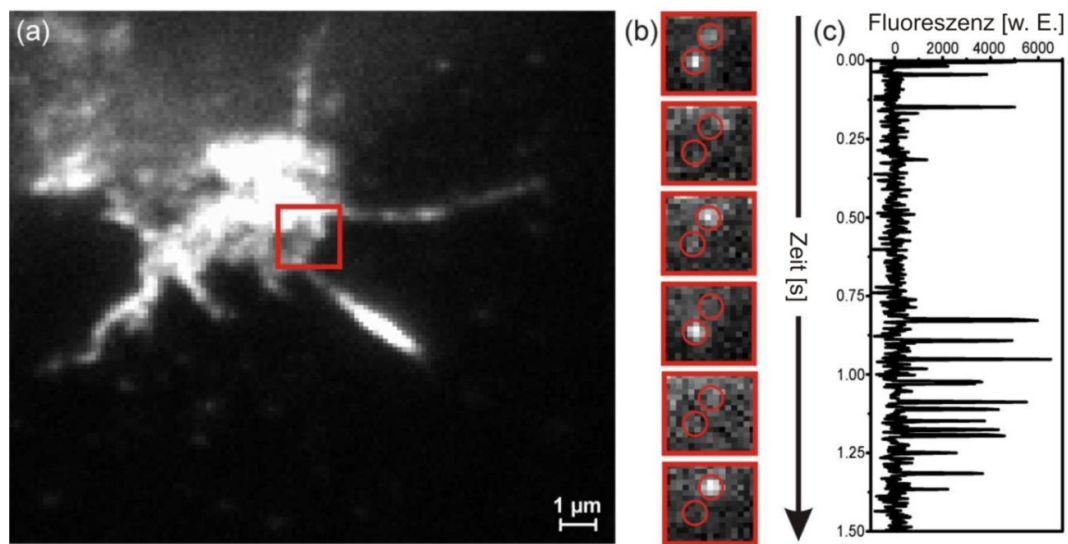


Abbildung 4.11: Blinkende ATTO655-Moleküle in einer lebenden Zelle: Gesamtaufnahme der Zelle (a), Teilausschnitt zu verschiedenen Zeitpunkten (b) und hintergrundkorrigierte Intensitätsspur eines blinkenden Moleküls (c).[55]

Das Signal-Rausch-Verhältnis war allerdings noch um einiges niedriger als im Fall der fixierten Zellen, was hauptsächlich an der erhöhten Hintergrund-Fluoreszenz lag. Ein Grund dafür war die fehlende Möglichkeit, nach dem Anfärben der Zielstruktur die übrig gebliebenen Farbstoffmoleküle zu entfernen. In fixierten Zellen war dies durch anschließendes Spülen mit Puffer einfach möglich gewesen. Das war in lebenden Zellen nicht der Fall. Die überschüssigen Farbstoffmoleküle verblieben im Zytoplasma oder banden unspezifisch an andere zelluläre Strukturen.

4. Ergebnisse und Diskussion

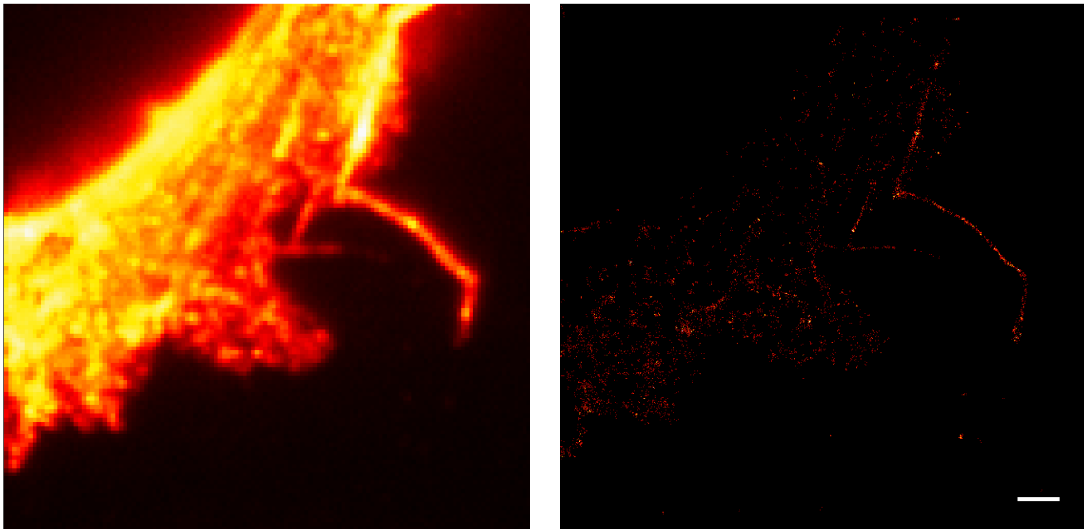


Abbildung 4.12: Konventionelles Weitfeldbild der Aktinfilamente einer lebenden 3T3-Zelle (links) und Lokalisierungshistogramm derselben Struktur (rechts). Die Anfärbung der Aktinfilamente geschah durch Mikroinjektion. Der Maßstab beträgt 1,0 μm .

Desweiteren konnte das von den Farbstoffmolekülen gezeigte Blinken nicht justiert und auf die hohe Farbstoffdichte angepasst werden. Dieses spiegelte sich auch in den erhaltenen supraaufgelösten Bildern wider (Abbildung 4.12), die zwar in den Randbereichen der Zellen, also in Regionen geringerer Farbstoffdichte, zufriedenstellende Ergebnisse lieferten, im Zellinneren jedoch aufgrund der hohen lokalen Farbstoffdichte keine aufgelösten Strukturen mehr zeigten.

4.2.4 Anfärbung durch Verwendung von Nanokörpern

Als Alternative zu der Markierung über Phalloidin wurden auch sogenannte Nanokörper (Chromotek) ausprobiert. Dafür wurden statt der üblichen 3T3-Zellen genetisch modifizierte HELA-Zellen verwendet. Diese wurden von der Arbeitsgruppe Leonhard der LMU München bezogen.[56, 57] Die Modifikation bestand darin, dass deren Tubulin mit dem Protein YFP (*yellow fluorescent protein*, gelb fluoreszierendes Protein) konjugiert war. Das YFP wurde dabei allerdings nicht als Fluorophor genutzt, sondern diente lediglich als Substrat für die Nanokörper. Die Nanokörper wiederum waren mit Atto655 markiert. Dies wurde zunächst an fixierten Zellen getestet. Abbildung 4.13 zeigt eine Beispielaufnahme.

4. Ergebnisse und Diskussion

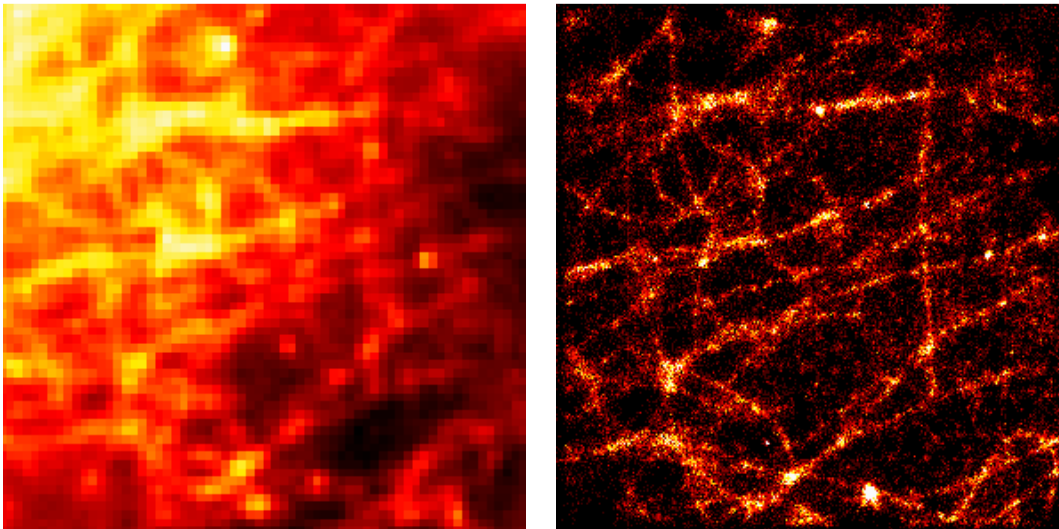


Abbildung 4.13: Konventionelles (links) und supraaufgelöstes (rechts) Bild der mit Nanokörpern angefärbten Mikrotubuli einer fixierten HELA-Zelle. Der Bildausschnitt entspricht einer Fläche von $12,8\ \mu\text{m}$ mal $12,8\ \mu\text{m}$.

Anschließend wurde versucht, die Messungen auch in lebenden Zellen durchzuführen. Die Injektion in die Zelle fand auf dieselbe Weise statt wie die der Phalloidin-Konjugate. Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern sollten sich die Nanokörper aufgrund der deutlich geringeren Molekülgröße einfach in eine Zelle injizieren lassen. Außerdem sind sie besser mit zellinnerem Milieu kompatibel.

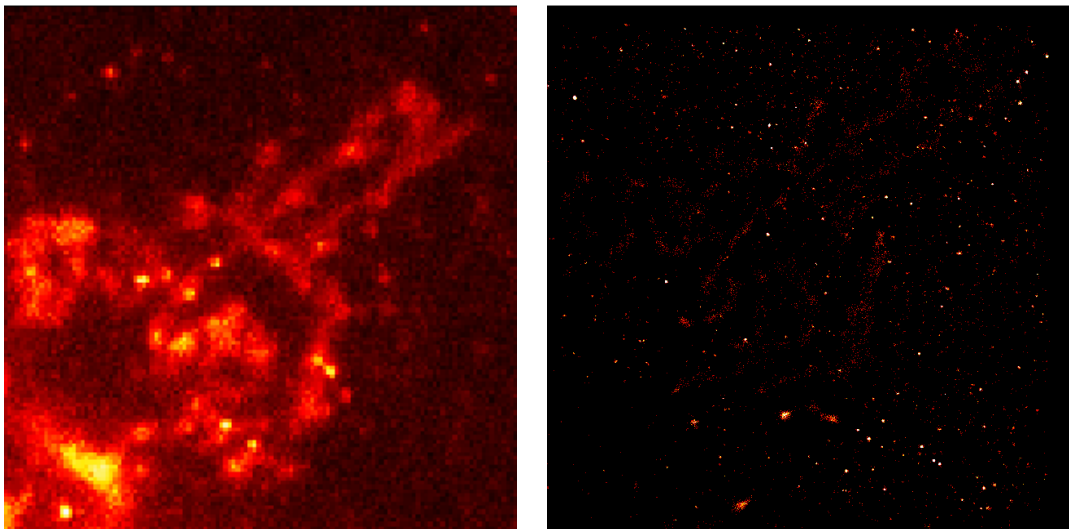


Abbildung 4.14: Weitfeldbild (links) der mit Nanokörpern angefärbten Mikrotubuli einer lebenden HELA-Zelle und Lokalisierungshistogramm (rechts) derselben Struktur. Der Bildausschnitt entspricht einer Fläche von $12,8\ \mu\text{m}$ mal $12,8\ \mu\text{m}$.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Versuche mit Nanokörpern in lebenden Zellen zeigten jedoch, dass es zwar gelang, durch Injektion die Nanokörper in das Zellinnere zu befördern, die Anbindung dort allerdings vorwiegend unspezifisch stattfand. Im Lokalisierungshistogramm war die anzufärbende Struktur in der Regel nicht mehr zu erkennen. Dies verdeutlicht Abbildung 4.14 an einer Beispielaufnahme (rechts).

4.3 Erzeugung regulärer Gitterstrukturen aus Fluorophoren

Um die Abhängigkeit des Auflösungsvermögens einer Mikroskopietechnik von verschiedenen Parametern, wie z.B. An- und Auszeiten systematisch zu untersuchen, ist es ideal, die Fluorophore in einem regulären Gitter anzuordnen. Ein solches Gitter wurde sowohl virtuell, d.h. mithilfe von Simulation, als auch experimentell durch Verwendung eines Rasterkraftmikroskops[58] erzeugt.

4.3.1 Simulationen

Bevor die Gitter experimentell realisiert wurden, wurden zunächst Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt. Diese bestanden in der Simulation des Signals beliebig platzierbarer punktförmiger Emitter, wobei Blinkkinetik und Signal-Rausch-Verhältnis beliebig einstellbar waren. Für die Simulation der Blinkkinetik wurde vereinfacht angenommen, dass ein Fluorophor genau drei Zustände annehmen kann, nämlich einen Anzustand, einen reversiblen Auszustand und einen irreversiblen Auszustand. Auf diese Weise kann sowohl Blinken als auch Bleichen dargestellt werden. Übergänge zwischen den Zuständen fanden in einem frei wählbaren Zeitraster statt, wobei dieses, um eine realistische Simulation zu gewährleisten, deutlich feiner als die Integrationszeit eingestellt werden sollte. Standardeinstellung war ein Zehntel der Integrationszeit. Der Startzustand war immer ein Anzustand, was auch der Realität entspricht, sofern Laseranregung und Aufnahme synchronisiert erfolgen. Die Übergangswahrscheinlichkeiten werden in Abhängigkeit des Zeitrasters und der vorgegebenen An- und Auszeiten errechnet. Weitere Eingabeparameter waren die Anzahl der Photonen während einer mittleren Anzeit, sowie die Intensität des Hintergrundrauschens. Aus der Anzahl der Photonen pro Anzeit wird die Anzahl der Photonen pro Zeitrastereinheit berechnet. Die Photonen werden separat betrachtet und zufällig auf die Pixel verteilt. Die zu Grunde liegende Verteilungsfunktion entspricht dabei genau der PSF. Das Hintergrundrauschen wird schließlich Pixelweise generiert und zum Signal addiert. Da Pixelwerte nicht negativ sein

4. Ergebnisse und Diskussion

sollten, erfolgt zusätzlich eine Addition mit einem konstanten Wert B . Die Simulationen wurden nun mit jeweils einer Filmlänge von 8000 Frames durchgeführt. Die mittlere Anzeit wurde auf 2,5 Frames eingestellt und die mittlere Photonenzahl pro Anzustand auf 800. Die mittlere Auszeit wurde entweder auf 25 ms, auf 250 ms oder auf 500 ms eingestellt. Als Anordnungsmuster wurden parallele Linien verwendet deren Abstand zwischen 50 nm und 300 nm variiert wurde. Bei der Anordnung der Emitter auf den Linien wurde zudem eine Platzierungsungenauigkeit berücksichtigt, für die ein Wert von 10 nm angenommen wurde, was dem für das verwendete Rasterkraftmikroskop bereits experimentell bekannten entsprach. Abbildung 4.15 zeigt eine solche Anordnung.

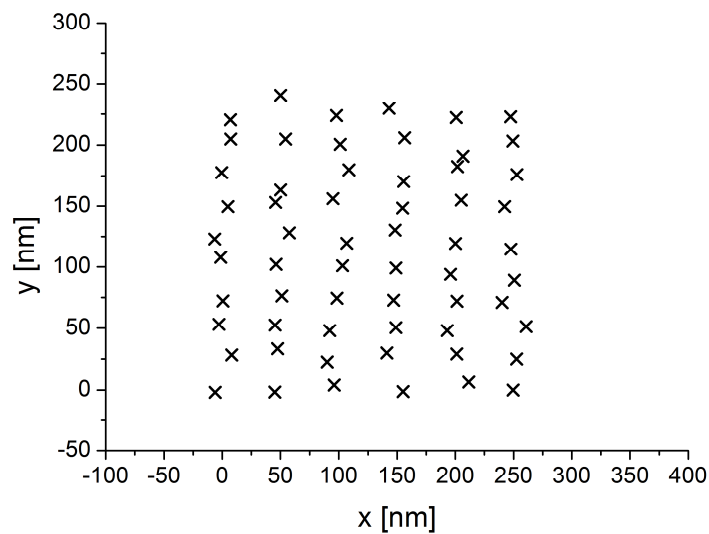


Abbildung 4.15: Typische Anordnung der simulierten Farbstoffmoleküle

Für jedes Parameterpaar wurden mehrere Simulationen durchgeführt. Für jedes Simulationsergebnis wurde entschieden, ob die Linien trennbar (gemäß Rayleigh-Kriterium) sind oder nicht. Die Quote an Gittern mit trennbaren Linien wurde schließlich gegen den Linienabstand aufgetragen, welches in Abbildung 4.16 zu sehen ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

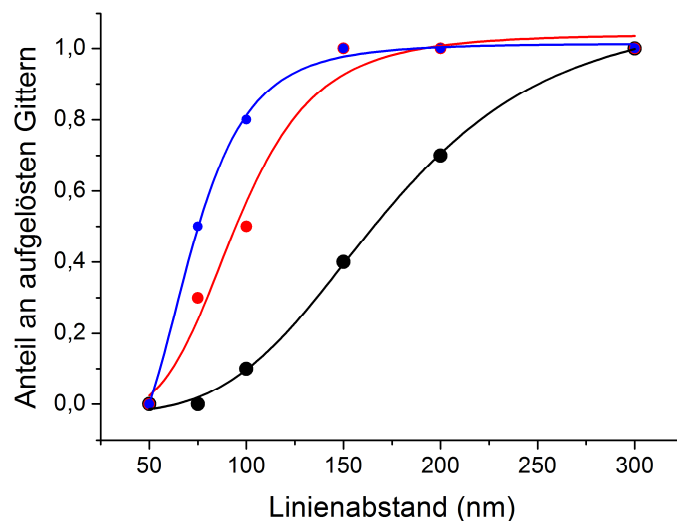


Abbildung 4.16: Auflösbarkeit simulierter Gitter in Abhängigkeit des Linienabstandes für ein Auszeit-Anzeit-Verhältnis von 10 (schwarz), 100 (rot) und 200 (blau)

Die Datenpunkte wurden schließlich mit einer sigmoidalen Funktion angepasst. Die Graphen zeigen qualitativ die erwarteten Abhängigkeiten der Auflösungswahrscheinlichkeit sowohl von der Gitterkonstante, als auch von dem Quotient aus Aus- und Anzeit.[26]

4.3.2 Verwendung eines Rasterkraftmikroskops

Eine analoge Messreihe wurde nun auch im realen Experiment durchgeführt. Mithilfe eines Rasterkraftmikroskops mit der sogenannten SMCP-Methode (*single molecule cut and paste*, Ausschneiden und Einfügen von Einzelmolekülen)[58] wurden nun Atto655-Moleküle in eben solchen Gittern angeordnet. Das Prinzip Methode ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

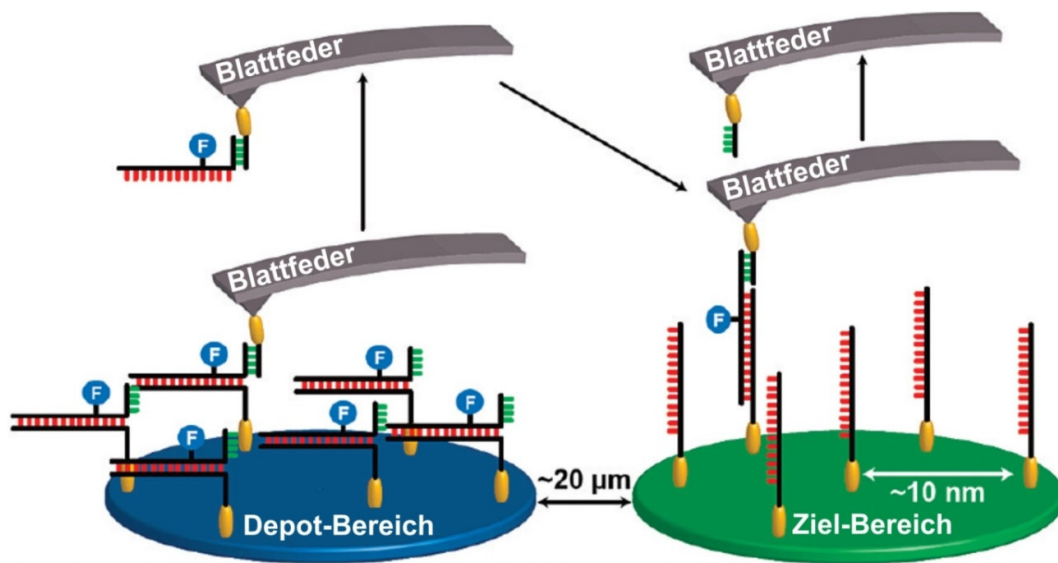


Abbildung 4.17: Prinzip der SMCP-Methode: Das an einen DNA-Strang gebundene Farbstoffmolekül (F) wird mithilfe der Blattfeder des Rasterkraftmikroskops aus dem Depot-Bereich genommen und auf den Ziel-Bereich platziert. Wichtig dabei ist ein hierarchisches Kraftsystem, sodass die Farbstoff-DNA in aufsteigender Bindungsstärke von der Depot-DNA, der Blattfeder-DNA und der Ziel-DNA-gebunden wird. Die Anbindung der DNA-Stränge an die Oberflächen wird jeweils durch einen PEG-Anker (orange) erreicht.[26]

Die angeordneten Atto655-Farbstoffmoleküle wurden mithilfe von Ascorbinsäure und Methylviologen zum Blinken gebracht, wobei die Konzentrationen von dem einzustellenden Auszeit-Anzeit-Verhältnis abhingen. Zusätzlich wurde ein kreuzförmiges Muster erstellt, welches innerhalb einer Struktur einen kontinuierlichen Übergang verschiedener Abstände enthält. Einen Überblick darüber gibt Abbildung 4.18.

4. Ergebnisse und Diskussion

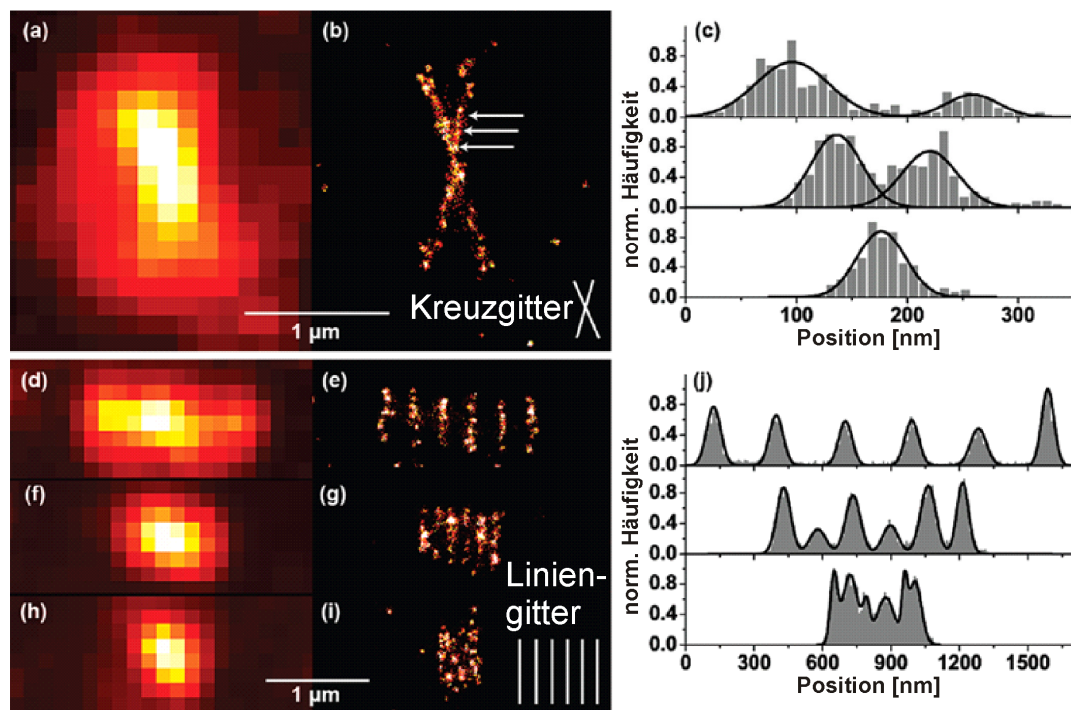


Abbildung 4.18: Durch Rasterkraftmikroskopie erzeugte Gitterstrukturen: Kreuzgitter in konventioneller (a) und superaufgelöster (b) Aufnahme mit drei verschiedenen Zeilenhistogrammen (c), gekennzeichnet durch die weißen Pfeile, drei Liniengitter mit unterschiedlichem Gitterabstand (300 nm, 150 nm und 75 nm) in konventioneller (d, f, h) und superaufgelöster (e, g, i) Aufnahme mit den jeweiligen Zeilenhistogrammen (j).[26]

Die Auswertung fand auf dieselbe Weise statt, was zu den in Abbildung 4.19 dargestellten Graphen führte.

4. Ergebnisse und Diskussion

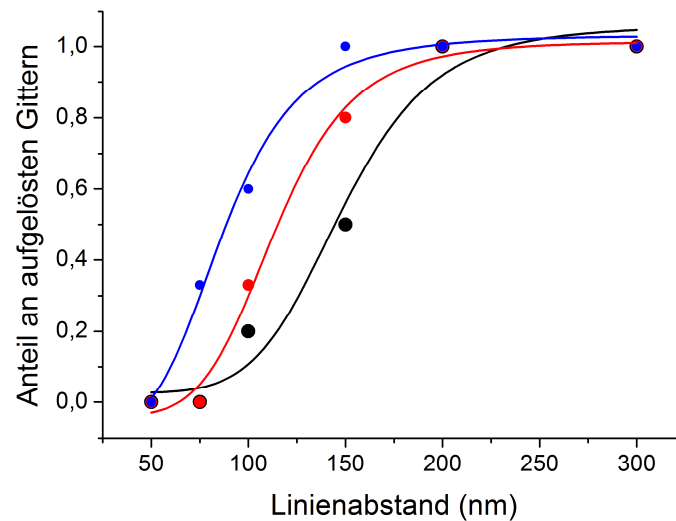


Abbildung 4.19: Auflösbarkeit von durch Rasterkraftmikroskopie erzeugten Gittern in Abhängigkeit des Linienabstandes für ein Auszeit-Anzeit-Verhältnis von 10 (schwarz), 100 (rot) und 200 (blau)

Somit lässt sich sowohl aus den Simulationen als auch aus den realen Messungen eine Abhängigkeit der Auflösung vom Auszeit-Anzeit-Verhältnis gewinnen. Dafür wird die Auflösung, also der trennbare Gitterabstand so definiert, dass ein Gitter mit diesem Linienabstand eine Auflösungsquote von 50% aufweist. Qualitativ unterscheidet sich dieser Zusammenhang zwischen Auflösung und Auszeit-Anzeit-Verhältnis nicht zwischen Simulationen und den durchgeführten Messungen. Ein Vergleich zwischen beiden Methoden ist in Abbildung 4.20 gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

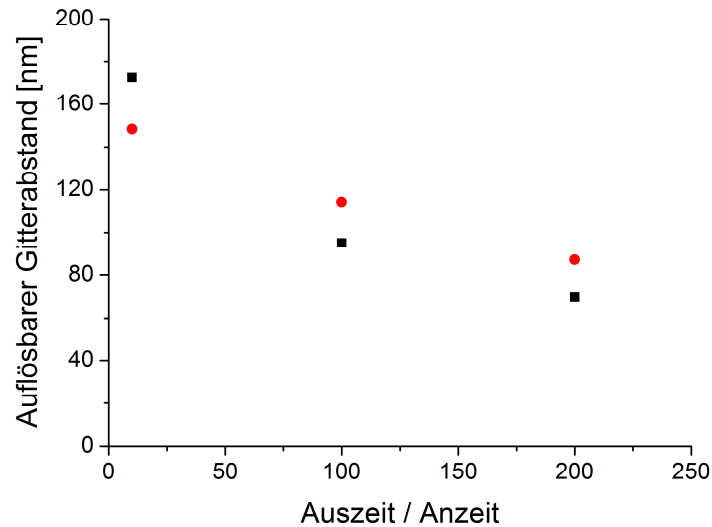


Abbildung 4.20: Auflösbarer Gitterabstand gegen das Auszeit-Anzeit-Verhältnis für Simulationen (schwarz) und Messungen (rot). Als trennbarer Gitterabstand wird der Abstand definiert, bei dem der Anteil an getrennten Gittern bei 50% liegt.

Quantitativ ist die Abhängigkeit vom Auszeit-Anzeit-Verhältnis im gemessenen Fall jedoch etwas geringer als im simulierten Fall. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Lokalisierungsgenauigkeit im Experiment möglicherweise trotz gleich eingestellter Photonenzahl etwas geringer ist als in der Simulation. Eine größere Limitierung durch die Lokalisierungsgenauigkeit verringert die Abhängigkeit von den Blinkbedingungen und somit vom Auszeit-Anzeit-Verhältnis.[26]

4.4 Anwendung der PAINT-Mikroskopie auf DNA-Origami-Strukturen

Neben der Blink-Mikroskopie wurde als weitere Superauflösungsmethode die PAINT-Mikroskopie angewendet.[12, 13] Gegenüber der Blink-Mikroskopie hat PAINT einige Vorteile. Zum einen ist die effektive Blinkkinetik deutlich einfacher einzustellen, da die Auszeit lediglich von der Konzentration des farbstoffmarkierten Strangs in der Lösung abhängt. Diese ist über viele Größenordnungen hinweg frei einzustellen. Ein weiterer Vorteil ist deutlich erhöhte Photostabilität, da für jede Anbindungsstelle immer wieder neue Farbstoffmoleküle aus der Lösung nachgeliefert werden. Dieser Umstand sorgt auch für ein drastisch erhöhtes Signal, da die Gesamtzahl der Photonen, die ein Farbstoffmolekül bis zum Bleichen emittiert, für eine Anbindungszeit genutzt werden kann. In der Blink-Mikroskopie dagegen muss diese Photonenzahl für die gesamte Aufnahme

4. Ergebnisse und Diskussion

ausreichen. Der gravierende Nachteil der PAINT-Mikroskopie ist jedoch das hohe Hintergrundsignal, welches durch die methodenbedingt hohe Farbstoffkonzentration in der Lösung verursacht wird. PAINT funktioniert daher nur in optimal eingestellter TIRF-Anregung, was die Anwendbarkeit dieser Methode auf flache Proben beschränkt. Als Proben zum Testen der PAINT-Mikroskopie wurden daher stets DNA-Origami-Strukturen verwendet.

4.4.1 Tetraeder

Polyedrische DNA-Strukturen sind deutlich älter als die DNA-Origami-Technik. So wurde bereits 1991 ein Würfel[59] und 1994 ein Oktaeder[60] aus DNA hergestellt. Später wurden auch Dodekaeder[61] und Tetraeder[62] hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendete Tetraeder-Struktur wurde von der Arbeitsgruppe Tim Liedl der LMU München entworfen und synthetisiert. Dabei wurden die drei bodennahen Kanten des über BSA-Biotin immobilisierten Tetraeders mit je einer PAINT-Anbindungsstelle versehen. Dieses ist schematisch in Abbildung 4.21 verdeutlicht.

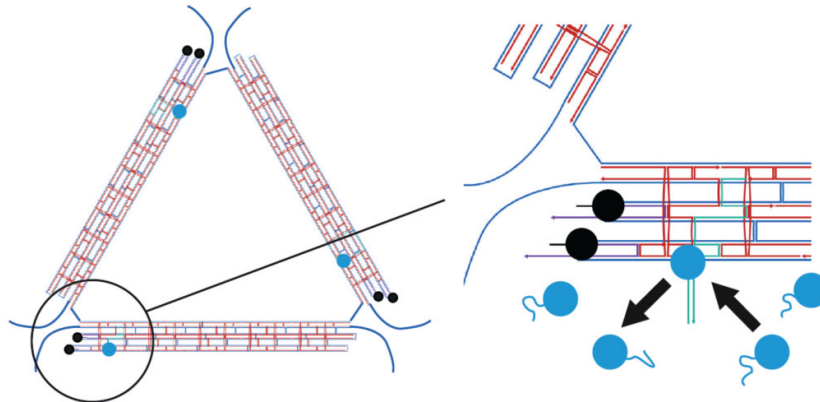


Abbildung 4.21: Schema der Tetraeder-Struktur. Die drei oberflächennahen Kanten tragen je zwei Biotin-Moleküle (schwarz) und eine PAINT-Anbindungsstelle (blau).[63]

Die drei PAINT-Anbindungsstellen bildeten ein gleichseitiges Dreieck mit einer Kantenlänge von 60 nm. Die Konzentration der PAINT-Stränge wurde auf 50 nM eingestellt. Für die Messungen wurden jeweils 2000 Frames mit einer Integrationszeit von 50 ms aufgenommen. Die anschließende Datenanalyse erfolgte auf dieselbe Weise wie in Fall der Blink-Mikroskopie.

4. Ergebnisse und Diskussion

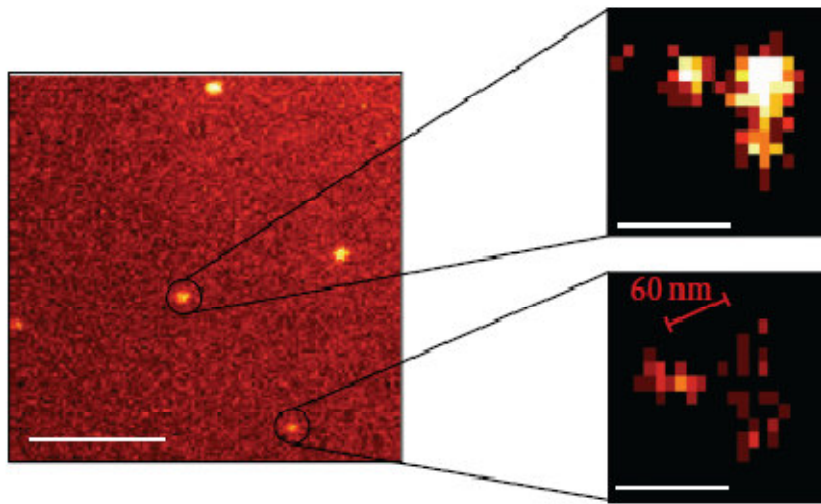


Abbildung 4.22: Konventionelles Fluoreszenzbild (links) der Tetraeder-Struktur und supraaufgelöste PAINT-Aufnahmen (Bildausschnitte rechts). Der Maßstab beträgt 4 μm (links) und 100 nm (rechts)[63]

In den supraaufgelösten Bildern ließen sich Spottriplets finden (Abbildung 4.22). Die Ausbeute war allerdings extrem gering und lag im unteren Prozentbereich. Jedoch wiesen die gefundenen Triplets die erwartete Form eines näherungsweise gleichseitigen Dreiecks auf. Die gemessene Kantenlänge von (68 ± 12) nm entsprach im Rahmen der Fehlergrenzen dem theoretischen Wert von 60 nm.[63]

4.4.2 Six-Helix-Bundles

Eine weitere Probe die mit der PAINT-Mikroskopie vermessen wurde waren sogenannte Six-Helix-Bundles[64], die in Kooperation von der Arbeitsgruppe Tim Liedl der LMU München erhalten wurden. Namensgebend für diese DNA-Origami-Struktur ist die Anordnung des scaffold-Stranges, der in sechs parallelen Linien das DNA-Origami durchläuft. Im Querschnitt bilden diese Linien ein reguläres Hexagon. Durch diesen Aufbau ergibt sich eine sehr längliche Struktur mit einer Länge von 386 nm. Das ermöglicht die Realisierung großer Abstände. Konkret wurden Farbstoffmoleküle im Abstand von 228 nm bzw. 114 nm verwendet. Begonnen wurde zunächst mit zwei Farbstoffmolekülen im Abstand von 228 nm. Eine schematische Darstellung der Struktur findet sich in Abbildung 4.23.

4. Ergebnisse und Diskussion

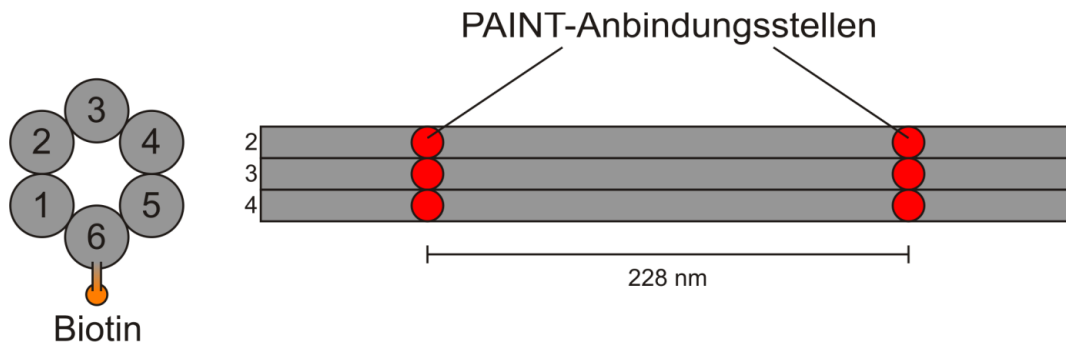


Abbildung 4.23: Schematische Skizze eines Six-Helix-Bundle: Der Querschnitt der Struktur (links) zeigt die Biotin-Verknüpfung (orange). Die Längensprojektion (rechts) beinhaltet die PAINT-Anbindungsstellen (rot) in einem Abstand von 228 nm.

Entsprechende Spot-Paare konnten im durch PAINT erzeugten superaufgelösten Bild auch detektiert werden (Abbildung 4.24).

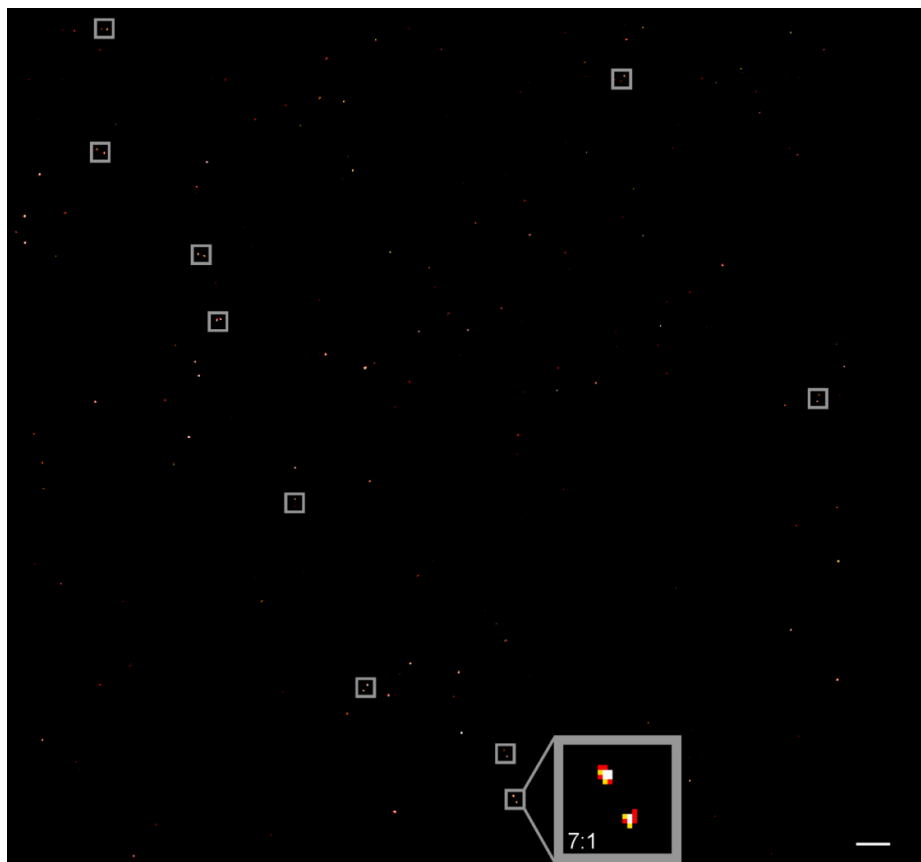


Abbildung 4.24: Superaufgelöstes Bild von Six-Helix-Bundles mit jeweils zwei Farbstoffmolekülen: Die grau markierten Bereiche enthalten aufgelöste Spot-Paare. Der Maßstab beträgt 500 nm

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Ausbeute war mit etwa 10% ein wenig höher als bei den zuvor vermessenen Tetraeder-Strukturen, allerdings immer noch deutlich geringer als normalerweise in vergleichbaren Messungen mit Blink-Mikroskopie erzielt wird. Dennoch war die Ausbeute genügend hoch, um mit ausreichend Statistik die Abstände zu vermessen. Ein Histogramm der vermessenen Abstände ist in Abbildung 4.25 dargestellt.

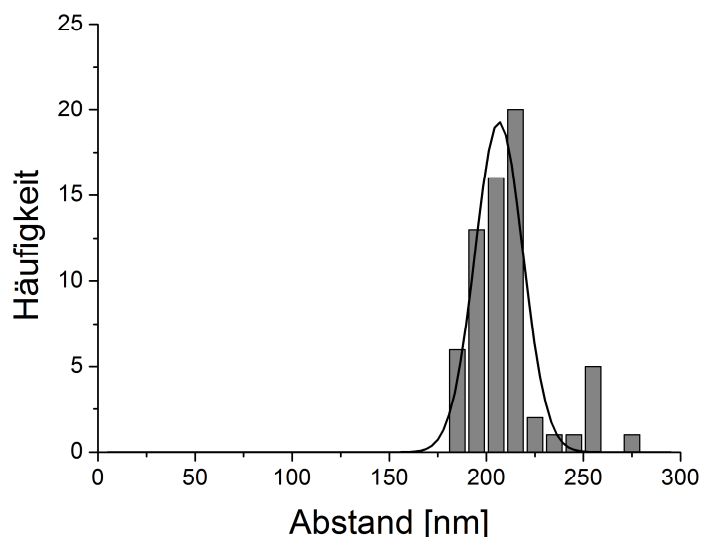


Abbildung 4.25: Histogramm der gemessenen Abstände.

Das Histogramm der vermessenen Abstände zeigt eine deutlich asymmetrische Verteilung. Deren Maximum liegt dabei etwa bei dem zu erwartenden Wert von 228 nm. Zusätzlich ergab sich eine Breite Population für geringere Abstandswerte, die zu einem Gesamtmittelwert von (206 ± 12) nm führen. Größere Werte kamen dagegen praktisch nicht vor. Dies lässt sich gut damit erklären, dass das Six-Helix-Bundle keine gerade Linie, sondern eine biegsame Struktur mit einer Persistenzlänge von etwa $1,6 \mu\text{m}$ ist.[65] Beim Anbinden auf die Oberfläche wird diese jedoch und verbleibt in einem mehr oder weniger gekrümmten Zustand. Je stärker die Krümmung der Struktur ist, desto geringer wird der tatsächliche Abstand der beiden Farbstoffmoleküle, wodurch sich genau die beobachtete Abstandsverteilung ergibt. Eine Bestimmung des mittleren Abstandes mithilfe eines Gauß-Fits war aufgrund der asymmetrischen Verteilung nicht möglich. Um das zu untersuchen, wurden nun für weitere Versuche Six-Helix-Bundles genutzt, in der Mitte zwischen den beiden Farbstoffmolekülen noch ein weiteres Molekül trugen (Abbildung 4.26).

4. Ergebnisse und Diskussion

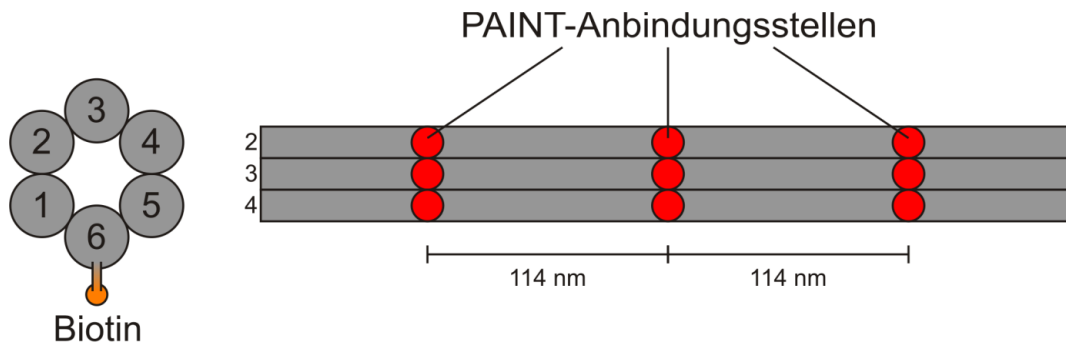


Abbildung 4.26: Schematische Skizze eines Six-Helix-Bundle: Der Querschnitt der Struktur (links) zeigt die Biotin-Verknüpfung (orange). Die Längenprojektion (rechts) beinhaltet die PAINT-Anbindungsstellen (rot) in einem Abstand von 114 nm.

Dadurch ergab sich ein direkter Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen von 114 nm. Diese DNA-Origami-Strukturen wurden nun auf dieselbe Weise mit der PAINT-Mikroskopie analysiert. Abbildung 4.27 zeigt ein Beispielbild.

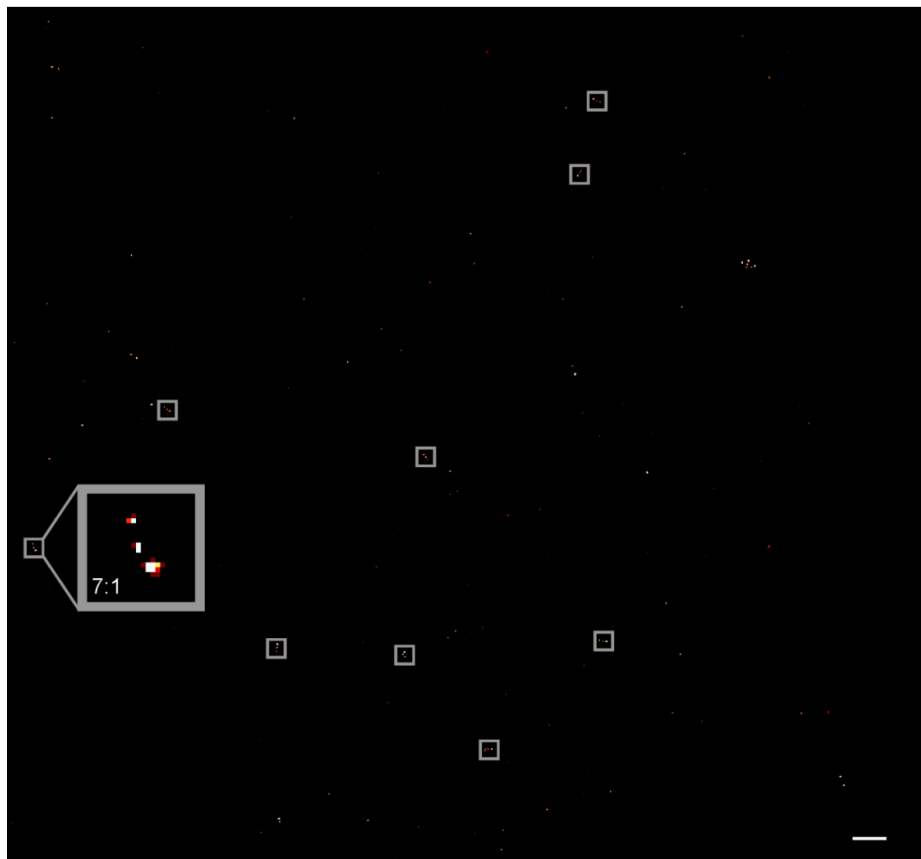


Abbildung 4.27: Superaufgelöstes Bild von Six-Helix-Bundles mit jeweils drei Farbstoffmolekülen: Die grau markierten Bereiche enthalten Spot-Triplets. Der Maßstab beträgt 500 nm.

4. Ergebnisse und Diskussion

In den PAINT-Bildern lässt sich gut die Verteilung der Krümmung erkennen. Die erhaltene Ausbeute entsprach ungefähr der im ersten Fall und war ebenso ausreichend für eine statistische Auswertung der Abstände. Deren Histogramm ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

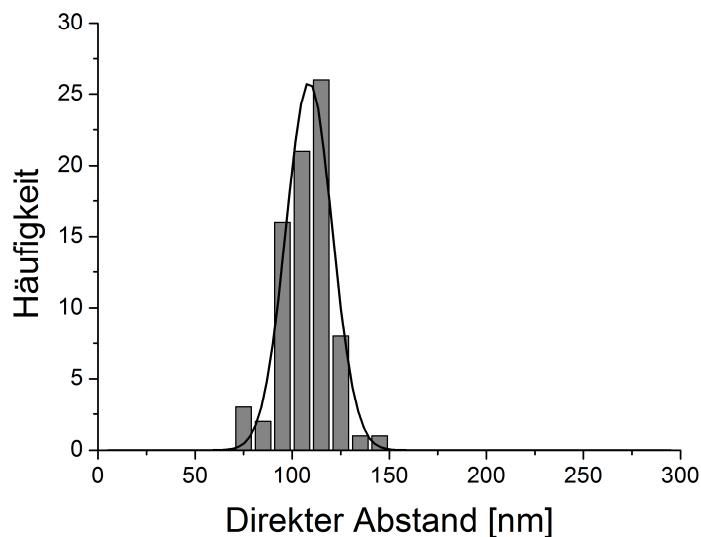


Abbildung 4.28: Histogramm der gemessenen Abstände zwischen benachbarten Anbindestellen. Das Histogramm wurde mit einer Gauß-Funktion angepasst.

Das Histogramm lässt sich mit einer Gauß-Funktion fitten. Der dabei erhaltene mittlere Abstand von (109 ± 12) nm weist nun sehr gute Übereinstimmung mit dem theoretisch erwarteten Wert auf. Die nachwievor beobachtete Abweichung nach unten liegt daran, dass das DNA-Origami auf der Längenskala von 100 nm zwar deutlich steifer, nicht jedoch vollständig gestreckt ist. Der Abstand der beiden äußeren Farbstoffmoleküle kann nun auch über die Addition der beiden Einzelabstände bestimmt werden. Abbildung 4.29 zeigt das resultierende Histogramm.

4. Ergebnisse und Diskussion

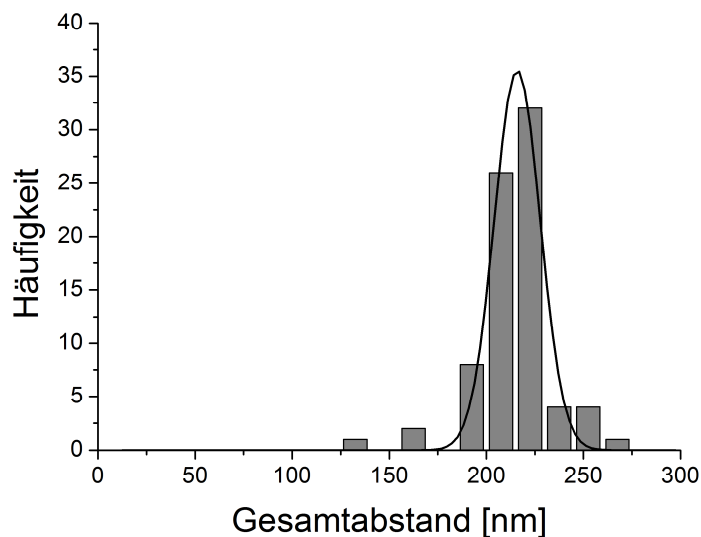


Abbildung 4.29: Histogramm der durch die Summen der paarweise gebildeten Abstände berechneten Gesamtabstände.

Dies ergibt einen Gesamtabstand von (216 ± 12) nm.

4.4.3 Photoinduziertes Bleichen von PAINT-Anbindungsstellen

Einer der wichtigsten Vorteile der PAINT-Methode gegenüber der Blink-Mikroskopie ist das deutlich verringerte Photobleichen. Während bei der Blink-Mikroskopie und anderen lokalisierungsbasierten Superauflösungsmethoden die maximale Anzahl an Lokalisierungen dadurch beschränkt ist, dass jedes Farbstoffmolekül aufgrund von Photobleichen nur eine endliche Anzahl an Photonen emittiert, gilt diese Beschränkung bei PAINT nicht, da geblichene Farbstoffmoleküle laufend durch intakte Moleküle aus der Lösung ersetzt werden. Da die Lösung als nahezu unerschöpfliches Reservoir an Farbstoffmolekülen betrachtet werden kann, sollte bei PAINT theoretisch gar kein photoinduziertes Bleichen auftreten. Dennoch wird auch bei PAINT-Mikroskopie der Übergang in einen irreversiblen Dunkelzustand beobachtet. Um dieses zu quantifizieren wurden systematische Messungen durchgeführt. Dafür wurde zunächst der grüne Farbstoff Cy3B verwendet und mit zwei Laserlinien der Wellenlängen 532 nm (5 mW) und 644 nm (400 mW) angeregt. Es wurde eine Reihe von Bleichkurven aufgenommen und jede Bleichkurve mit einer Exponentialfunktion angepasst. Eine Beispielspur ist in Abbildung 4.30 gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

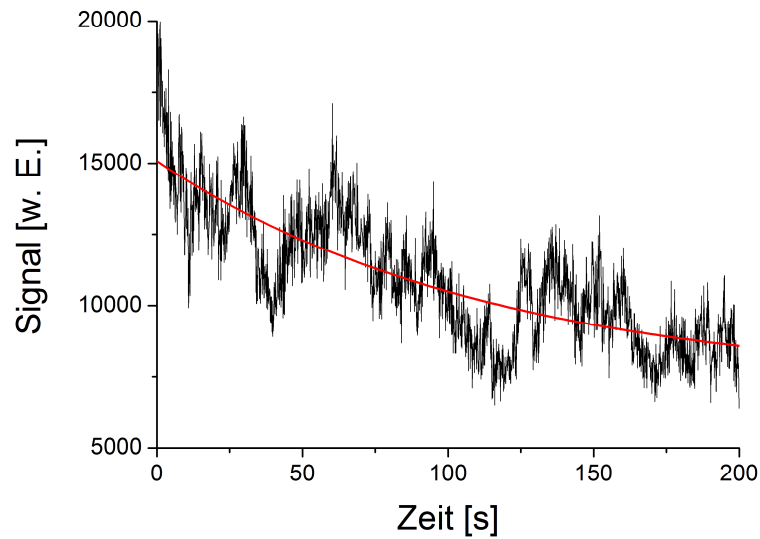


Abbildung 4.30: Eine typische Bleichspur eines DNA-Origamis mit mehreren PAINT-Anbindungsstellen zeigt eine zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Die Auswertung ergab eine mittlere Lebensdauer von (138 ± 62) s. Dieselbe Messung wurde wiederholt, wobei nun allerdings der Farbstoff Atto655 frei zugesetzt wurde. Eine Beispielkurve dafür zeigt Abbildung 4.31.

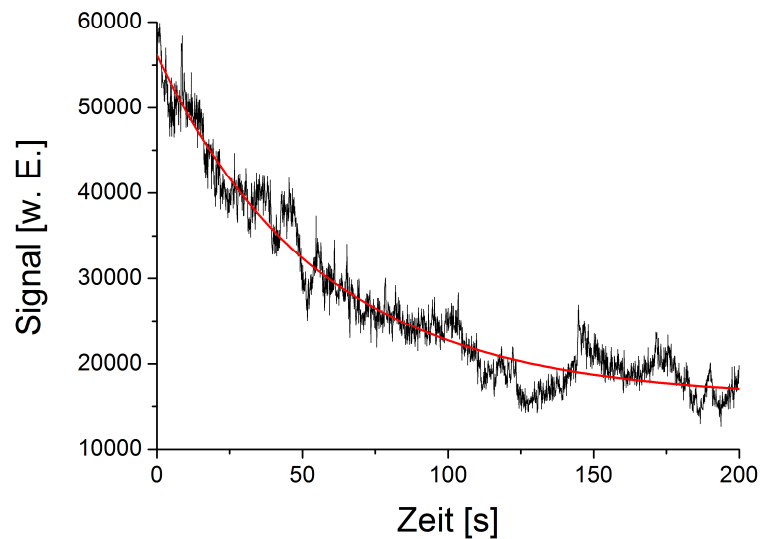


Abbildung 4.31: Typische Bleichspur eines DNA-Origamis mit PAINT-Anbindungsstellen unter Anwesenheit freien roten Farbstoffs

4. Ergebnisse und Diskussion

Nun ergab sich eine mittlere Lebensdauer von (63 ± 9) s. Der Unterschied zwischen dem Fall ohne Atto655 und dem Fall mit diesem Farbstoff konnte damit erklärt werden, dass der durch den roten Laser photoaktivierte Farbstoff irreversible mit der DNA der Anbindungsstelle reagiert und diese dadurch zerstört wird. Aufgrund der reduzierenden Wirkung von Trolox wurde vermutet, dass die Lebensdauer der PAINT-Anbindungsstelle unter Trolox eine deutlich längere Lebensdauer aufweisen sollte. Deshalb wurde die Messung erneut durchgeführt, wobei nun in der Lösung 200 mM Trolox vorlagen. Abbildung 4.32 zeigt eine Beispielspur dafür.

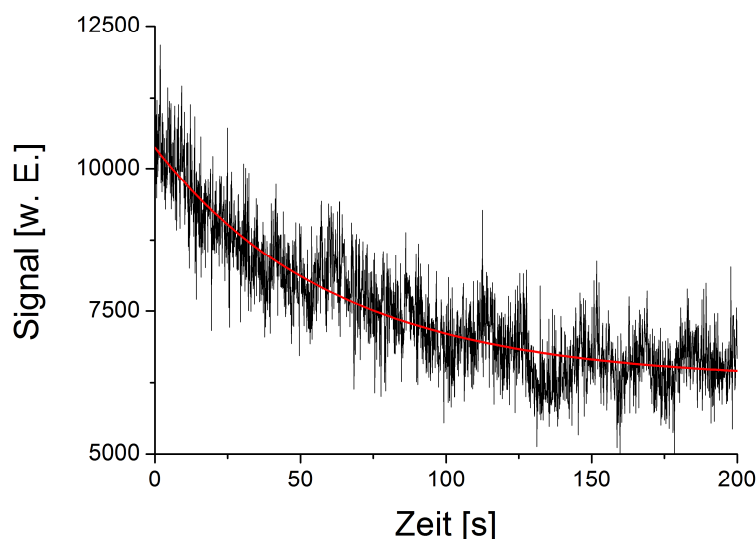


Abbildung 4.32: Typische Bleichspur eines DNA-Origamis mit PAINT-Anbindungsstellen bei Anwesenheit eines freien roten Farbstoffs unter Trolox

In diesem Fall ergab sich jedoch eine mittlere Lebensdauer von (52 ± 13) s, was im Rahmen der Fehlergrenzen ist dieser Wert identisch mit der Lebensdauer, die unter Trolox-freier Bedingung gemessen wurde. Somit konnte keine stabilisierende Wirkung durch Trolox nachgewiesen werden.

4.4.4 DNA-Chip

Nachdem, wie in den vorigen Abschnitten beschrieben, das prinzipielle Funktionieren der PAINT-Mikroskopie demonstriert wurde, sollte diese Methode nun angewendet werden. Dafür wurde der sogenannte DNA-Chip genutzt. Dieser wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Liedl hergestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

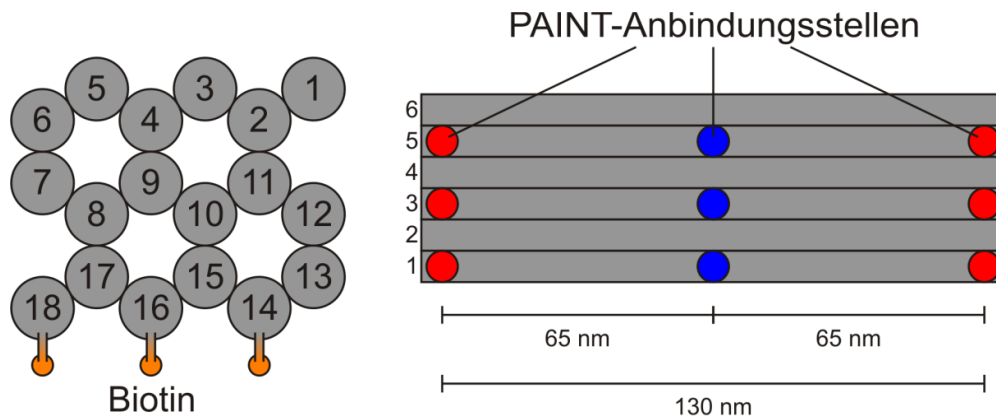


Abbildung 4.33: Schema des DNA-Chips: Der Querschnitt der Struktur (links) zeigt die Biotin-Verknüpfungen (orange). Die Längenprojektion (rechts) beinhaltet die freien (rot) und geschlossenen (blau) PAINT-Anbindungsstellen.

Der DNA-Chip ist ein 130 nm langes 18-Helix-Bundle. An den Enden verfügt dieser über je drei PAINT-Anbindungsstellen. Zusätzlich befinden sich in der Mitte drei geschlossene PAINT-Anbindungsstellen. Diese könne durch das Anbinden eines Aktivator-Stranges geöffnet werden. Der Aufbau des DNA-Chips ist in Abbildung 4.33 veranschaulicht. Der Sinn dieser Konstruktion bestand darin, eine Möglichkeit zu generieren, kurze DNA-Stränge zu detektieren. Dies wird dadurch erreicht, dass die mittlere Anbindungsstelle des DNA-Chips zunächst so konstruiert wird, dass die zum Öffnen erforderliche Aktivator-Sequenz genau der des zu detektierenden DNA-Stranges entspricht. Die Detektion des DNA-Stranges besteht dann darin, dass PAINT-Aufnahmen von dieser Struktur gemacht werden. Zeigen die Bilder nur Spot-Paare, so enthält die Lösung den zu detektierenden DNA-Strang nicht, zeigen sie jedoch Spot-Triplets, so ist der DNA-Strang erfolgreich detektiert. Um die praktische Durchführbarkeit zu überprüfen, wurde der DNA-Chip sowohl mit als auch ohne Aktivator-Strang mit PAINT-Mikroskopie vermessen. Zunächst wurden Messungen ohne Aktivator-Strang durchgeführt. Das Histogramm der Abstände ist in Abbildung 4.34 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

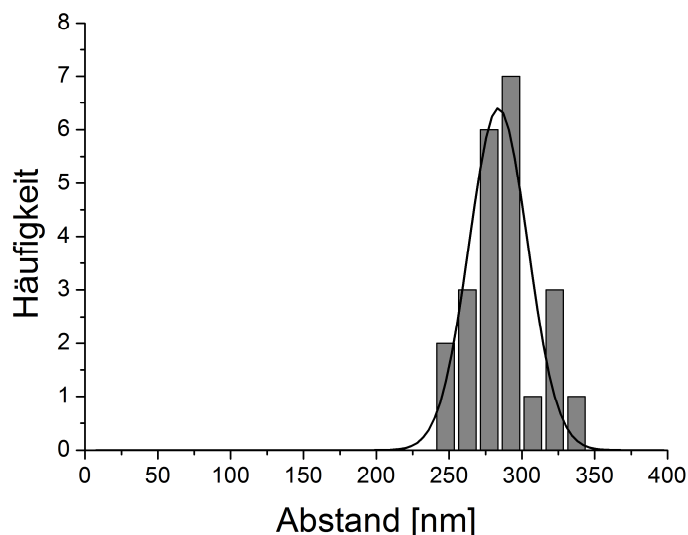


Abbildung 4.34: Histogramm der am DNA-Chip gemessenen Abstände

Die gemessenen Abstände entsprachen allerdings nicht den zu erwartenden 130 nm, sondern waren etwa um den Faktor zwei zu groß. Nach dem Hinzufügen des Aktivator-Stranges konnten dann keine Spot-Paare mehr detektiert werden. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist eine inkorrekte Faltung der DNA-Origami-Struktur. Dieses könnte bewirken, dass sich die PAINT-Anbindungsstellen nicht in dem erwarteten Abstand befinden und somit der gemessene Abstand vom theoretischen stark abweicht.

4.5 Verwendung von DNA-Origami-Strukturen als Standards für die Super-Auflösung

In Kapitel 4.3 wurde die Bedeutung regulärer Farbstoffanordnungen für die Bestimmung des Auflösungsvermögens einer Superauflösungs-Methode diskutiert. Ferner wurde beschrieben, dass die Realisierung solcher regulären Gitterstrukturen mithilfe eines Rasterkraftmikroskops möglich ist.[26] Jedoch weist eine solche Herangehensweise eine Reihe von Nachteilen auf. Zum einen war die Platzierungsgenauigkeit begrenzt, d.h. dass die platzierten Farbstoffmoleküle stets eine mittlere Abweichung von ungefähr 10 nm bis 20 nm von der Sollposition aufwiesen. Desweiteren war der Platzierungsvorgang vollständig seriell. Die für eine statistische Auswertung erforderliche große Anzahl an Gitterstrukturen zieht somit einen vergleichsweise hohen Zeitaufwand nach sich. Deshalb wurde ebenso ein anderes System verwendet, um reguläre Farbstoffanordnungen

4. Ergebnisse und Diskussion

herzustellen. Diese waren die DNA-Origami-Strukturen.[27] Diese ermöglichen eine hochpräzise Anordnung von Farbstoffmolekülen, deren mittlere Abweichung vom Sollwert etwa eine Größenordnung geringer ist als bei der Methode mit Rasterkraftmikroskopie. Desweiteren ist die DNA-Origami-basierte Methode vollständig parallelisiert, d.h. dass mit einem einzigen Ansatz beliebig viele Strukturen erzeugt werden können.

4.5.1 Abstandsmessungen auf rechteckigen DNA-Origami-Strukturen

Als einfachste Probe wurde dafür zunächst ein rechteckiges DNA-Origami verwendet, welches zwei Farbstoffmoleküle in einem Abstand von 89,5 nm trägt. Schematisch ist dieses in Abbildung 4.35 dargestellt.

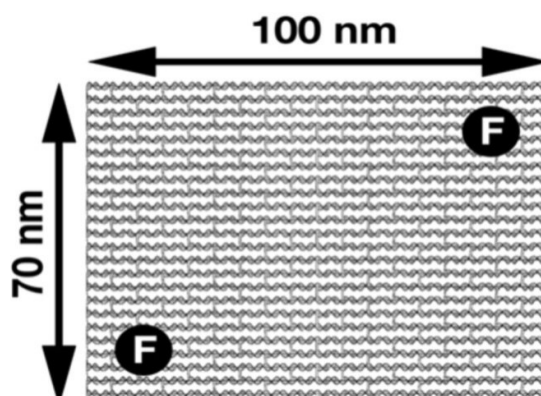


Abbildung 4.35: Schema eines DNA-Origami-Rechtecks mit zwei Farbstoffmolekülen in einem Abstand von 90 nm.[43]

Der Abstand wurde als erstes mit Blink-Mikroskopie vermessen. Als Redox-Zugabe wurden 50 μ M Ascorbinsäure verwendet. Die Integrationszeit betrug 30 ms. Ein Beispielbild ist in Abbildung 4.36 gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

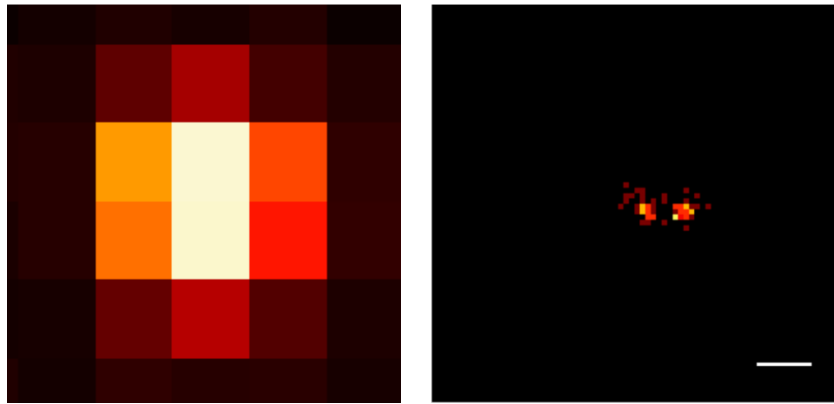


Abbildung 4.36: DNA-Origami-Rechteck mit zwei Farbstoffmolekülen im Weitfeld aufgenommen (links) und superaufgelöst (rechts). Der Maßstab beträgt 100 nm.

Die Abstände wurden vermessen und in ein Histogramm getragen, welches in Abbildung 4.37 dargestellt ist.

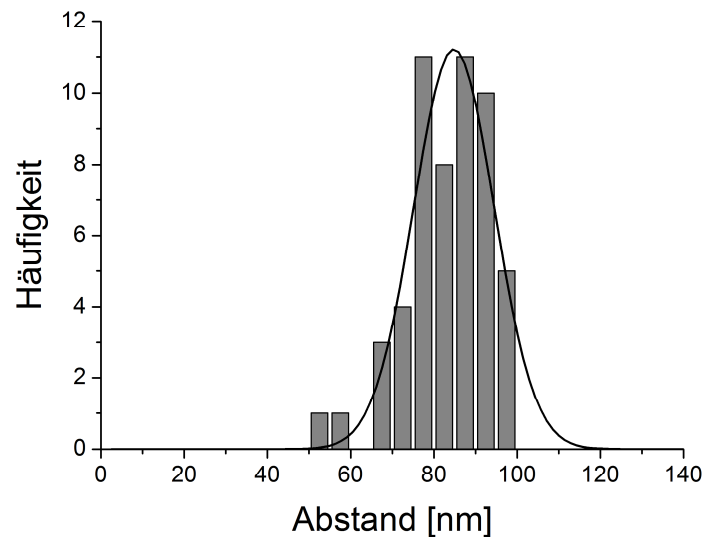


Abbildung 4.37: Histogramm der mit Blink-Mikroskopie vermessenen Abstände am DNA-Origami-Rechteck

Die Auswertung ergab einen mittleren Abstand von $(84,8 \pm 9,7)$ nm. Dies entsprach gut dem theoretischen Wert. Die geringe Abweichung nach unten lässt sich durch eine leichte Krümmung der DNA-Origami-Struktur erklären. Das gleiche DNA-Origami wurde genauso mithilfe der SHRIMP-Methode untersucht. Abbildung 4.38 zeigt das resultierende Histogramm.

4. Ergebnisse und Diskussion

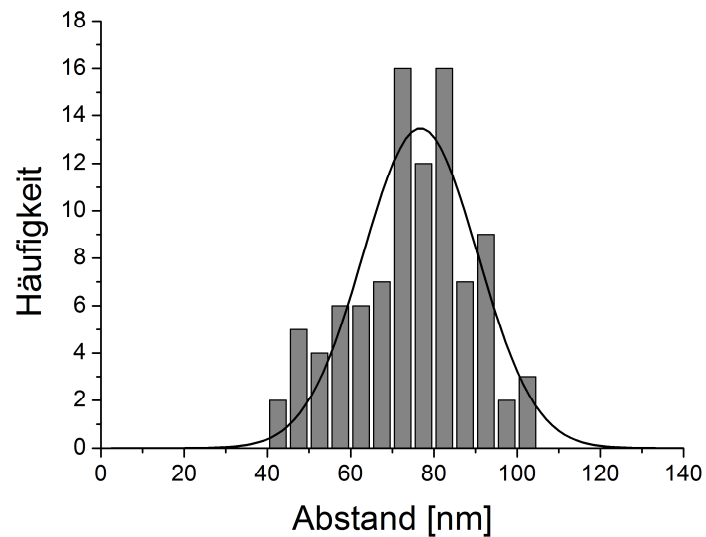


Abbildung 4.38: Histogramm der mit SHRImp gemessenen Abstände am DNA-Origami-Rechteck

Die Auswertung der Abstände ergab nun einen mittleren Abstand von (77 ± 14) nm. Dieser war ähnlich zu dem mithilfe der Blink-Mikroskopie bestimmten etwas geringer als der theoretische. Ebenso weicht dieser Wert vom Literaturwert ab.[43] Diese Abweichung liegt jedoch im Rahmen der Fehlergrenzen. Dieses DNA-Origami wurde nun weiterhin verwendet um kürzere Abstände zu realisieren. Es wurde anschließend mit Blink-Mikroskopie vermessen. Zunächst wurden solche mit einem Farbstoffabstand von 60 nm betrachtet. Dies ergab das in Abbildung 4.39 dargestellte Histogramm.

4. Ergebnisse und Diskussion

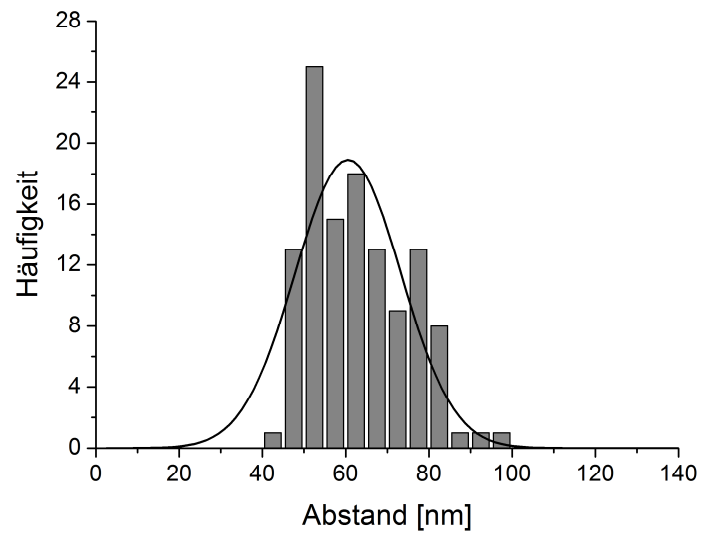


Abbildung 4.39: Histogramm der mit Blink-Mikroskopie vermessenen Abstände an einem DNA-Origami-Rechteck mit einem theoretischen Farbstoffabstand von 60 nm

Die Messung ergab einen mittleren Abstand von (61 ± 13) nm. Anschließend wurde ein Farbstoffabstand von 40 nm auf dem DNA-Origami realisiert und erneut mit Blink-Mikroskopie vermessen.

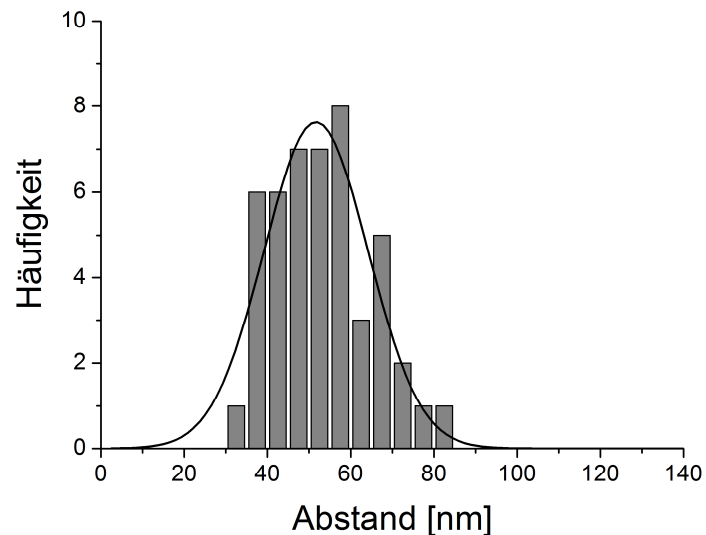


Abbildung 4.40: Histogramm der mit Blink-Mikroskopie vermessenen Abstände an einem DNA-Origami-Rechteck mit einem theoretischen Farbstoffabstand von 40 nm

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Histogramm (Abbildung 4.40) ergab einen mittleren Abstand von (52 ± 13) nm. Generell lässt sich also sagen, dass die Richtung der Abweichung vom theoretischen Wert von diesem abhängig ist. Für große Abstände ist eine Abweichung der gemessenen Werte nach unten zu beobachten, während diese für kleine Abstände eher nach oben abweichen. Dies liegt daran, dass der krümmungsbedingte Effekt erstens für kleine Abstände geringer ist und zweitens durch einen anderen Effekt überkompensiert wird. Dieser Effekt rührt daher, dass Abstände, die zu kurz sind, um aufgelöst werden zu können, nicht in der Statistik auftauchen. Dieses Aussortieren tritt bei kurzen theoretischen Abständen deutlich häufiger auf und verschiebt den Gesamtmittelwert in Richtung größere Abstände. Dennoch waren die Abweichungen in allen Fällen gering, wodurch gezeigt werden konnte, dass sich DNA-Origami-Strukturen als Auflösungsstandards eignen.

4.5.2 Automatisierte Auswertung von Abstandsmessungen

Alle bisher durchgeführten Abstandsmessungen bedurften einer zeitaufwändigen statistischen Auswertung, d.h. es musste eine Vielzahl von Abständen bestimmt werden, damit ein gesicherter Mittelwert bestimmt werden konnte. Deshalb sollte dieser Prozess automatisiert werden. Desweiteren besteht bei manueller Auswahl der Strukturen die Gefahr der Erzeugung eines, vom Experimentator abhängigen, systematischen Fehlers in der Abstandsbestimmung. Um dieses zu vermeiden, wurde folgender Algorithmus entwickelt. Im ersten Schritt wird ein Histogramm aller Abstände zwischen den einzelnen errechneten Lokalisierungen erstellt. Die Abstände zwischen den einzelnen Lokalisierungen sind dabei nicht zu verwechseln mit den Abständen zwischen den Spots.

4. Ergebnisse und Diskussion

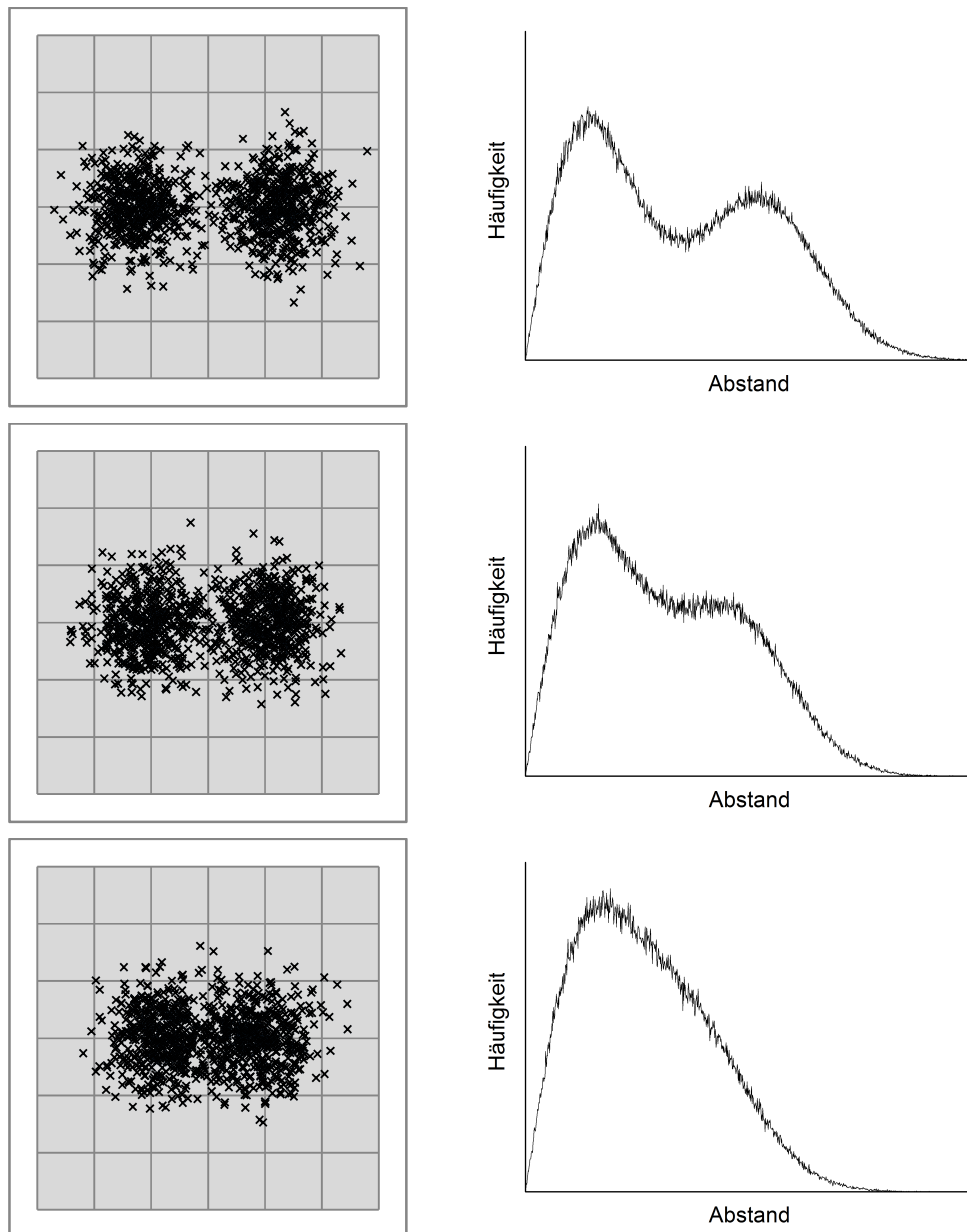


Abbildung 4.41: Form des Abstandshistogramms für verschiedene Spotabstände. Der Abstand der Lokalisierungsspots (links) verringert sich von oben nach unten, wodurch eine zunehmende Verschmelzung der Maxima in den Abstandshistogrammen (rechts) erkennbar ist.

Wie Abbildung 4.41 zeigt, ergeben sich für einen großen Spot-Abstand im Histogramm der Lokalisierungsabstände zwei Maxima. Das erste entspricht dabei der Verteilung der Abstände zwischen zwei Lokalisierungen im selben Spot. Dessen Position ist also im Prinzip ein Maß für die Lokalisierungsgenauigkeit, die umso schlechter ist, je weiter das Maximum nach rechts verschoben ist. Das zweite Maximum gibt die Verteilung der Abstände wieder, die zwischen zwei Lokalisierungen in unterschiedlichen Spots

4. Ergebnisse und Diskussion

gemessen wurden. Die Position dieses Maximums gibt somit den gesuchten Abstand der beiden Spots wieder. Für kürzere Spot-Abstände verschmelzen beide Verteilungen jedoch zunehmend zu einer und es lassen sich keine zwei Maxima mehr trennen. Um die beiden Verteilungen dennoch trennen zu können musste versucht werden, diese zu modellieren. Allgemein gilt:

$$f(x) = c(x) + d(x) \quad (4.23)$$

Dabei ist $f(x)$ die gemessene Gesamtverteilung, $c(x)$ die Verteilung der Abstände innerhalb eines Spots und $d(x)$ die Verteilung der Abstände zwischen den Spots. Für die Form der Verteilungsfunktion $c(x)$ wurde eine zweidimensionale Maxwell-Boltzmann-Verteilung angenommen.

$$c(x) = axe^{-bx^2} \quad (4.24)$$

Die Annahme lag darin begründet, dass diese Gleichung exakt die Verteilung der Abstände der Lokalisierungen zum Zentrum des Spots beschreibt, sofern die Lokalisierungen innerhalb des Spots gaußförmig verteilt sind. Die Richtigkeit der Übertragung auf die Verteilung der Abstände zwischen den Lokalisierungen wurde mithilfe einer Monte-Carlo-Simulation überprüft. Die Ergebnisse der Simulation sind in Abbildung 4.42 dargestellt.

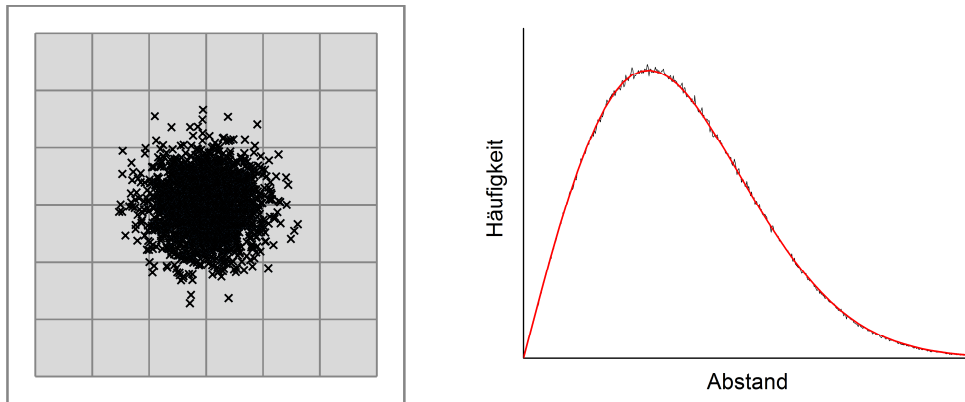


Abbildung 4.42: Abstandshistogramm (rechts, schwarz) eines simulierten Lokalisierungsspot (links). Zusätzlich ist das theoretische Modell aufgetragen (rechts, rot)

Diese zeigten, dass die bestimmte und die theoretisch angenommene Verteilungsfunktionen exakt übereinander lagen. Somit war die Annahme korrekt. Die gesuchte Verteilung $d(x)$ konnte also nun berechnet werden.

$$d(x) = f(x) - c(x) = f(x) - axe^{-bx^2} \quad (4.25)$$

Die freien Parameter a und b wurden dabei so bestimmt, dass die Maxima der gemessenen Verteilung $f(x)$ und das der berechneten Verteilung $c(x)$ auf identischen

4. Ergebnisse und Diskussion

Punkten lagen. Das Funktionieren dieser Methode wurde zunächst in Simulationen überprüft (Abbildung 4.43).

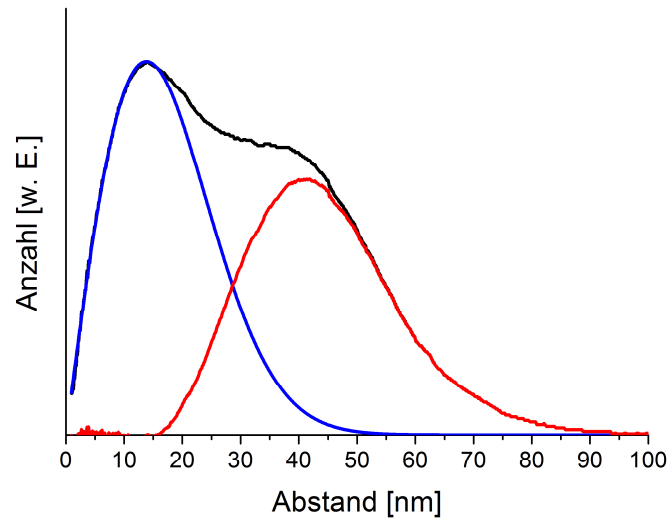


Abbildung 4.43: Abstandshistogramm (schwarz) eines simulierten Spotpaares in einem Abstand von 40 nm: Nach Subtraktion der theoretisch berechneten Verteilung für Spot-interne Abstände (blau) bleibt die Verteilung der Abstände zwischen den Spots (rot). Diese zeigt ein Maximum bei dem erwarteten Wert von 40 nm.

Anschließend wurde sie auf reale Messdaten (DNA-Origamis mit Farbstoffabständen von 60 nm bzw. 40 nm) angewendet. Die resultierenden Abstandshistogramme sind in Abbildung 4.44 bzw. in Abbildung 4.45 aufgetragen.

4. Ergebnisse und Diskussion

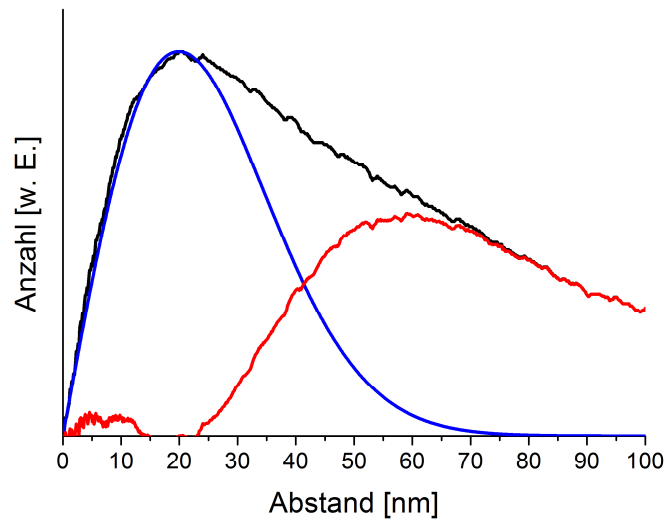


Abbildung 4.44: Abstandshistogramm (schwarz) eines DNA-Origami-Rechtecks mit einem Farbstoffabstand von 60 nm. Die Verteilung der Abstände zwischen den Spots (rot) zeigt ein Maximum bei 63 nm.

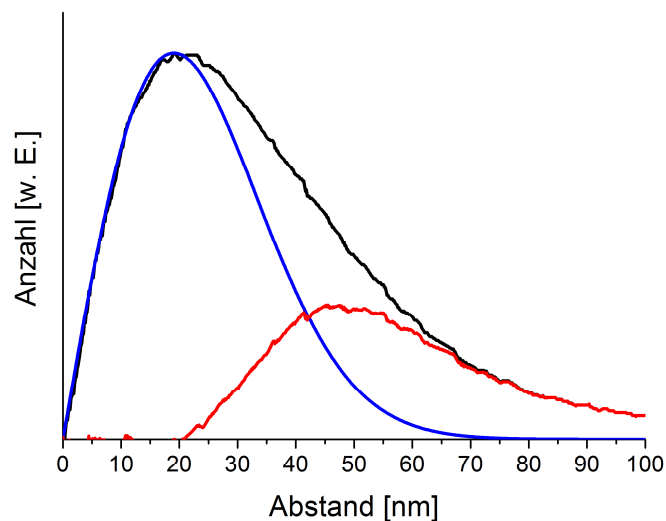


Abbildung 4.45: Abstandshistogramm (schwarz) eines DNA-Origami-Rechtecks mit einem Farbstoffabstand von 40 nm. Die Verteilung der Abstände zwischen den Spots (rot) zeigt ein Maximum bei 46 nm.

In allen Fällen lieferte die Methode das richtige Ergebnis. Ein Problem war allerdings noch die unsaubere Bestimmung der Parameter a und b . Die Methode des Übereinanderlegens der Maxima von $f(x)$ und $c(x)$ vernachlässigte den Einfluss von $d(x)$ auf die Lage des Maximums von $f(x)$. Diese Näherung ist für große Spot-Abstände korrekt und sinnvoll, für

4. Ergebnisse und Diskussion

kleine Spot-Abstände jedoch führt sie zu einer systematischen Abweichung des Ergebnisses. Um das zu umgehen wurde nun ein anderer Ansatz verfolgt. Dafür wurde zunächst $d(x)$ als Gaußfunktion beschrieben.

$$d(x) = he^{-\frac{1}{2\sigma^2}(x-x_0)^2} \quad (4.26)$$

Somit ließ sich $f(x)$ schreiben als

$$f(x) = c(x) + d(x) = axe^{-bx^2} + he^{-\frac{1}{2\sigma^2}(x-x_0)^2} \quad (4.27)$$

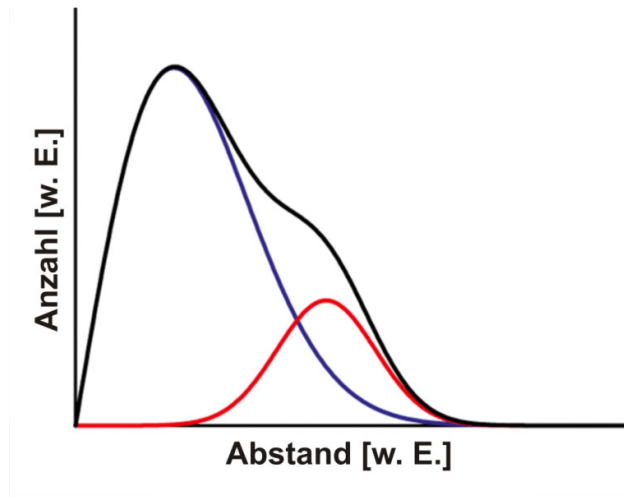


Abbildung 4.46: Schematische Darstellung der Funktion f (schwarz) als Summe der Funktionen c (blau) und d (rot)[28]

Die drei Funktionen sind schematisch in Abbildung 4.46 aufgetragen. Das gemessene Histogramm $f(x)$ wurde nun mit eben dieser Funktion angepasst, wodurch die freien Parameter a , b , h , σ und x_0 bestimmt werden konnten. Der Parameter x_0 entsprach dabei genau dem gesuchten Abstand der beiden Spots.[28]

4.5.3 Standards für dreidimensionale Superauflösungsmikroskopie

In den vorherigen Abschnitten wurden DNA-Origami-Strukturen vorgestellt, die als Standards für lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie genutzt werden konnten. Allerdings beschränkte sich das ausschließlich auf den zweidimensionalen Fall. Im folgenden Abschnitt wird nun auch der dreidimensionale Fall betrachtet. Zur Realisierung eines Standards für diesen Fall stand eine als „Rakete“ oder auch „Nanosäule“ bezeichnete DNA-Origami-Struktur zur Verfügung.[66]

4. Ergebnisse und Diskussion

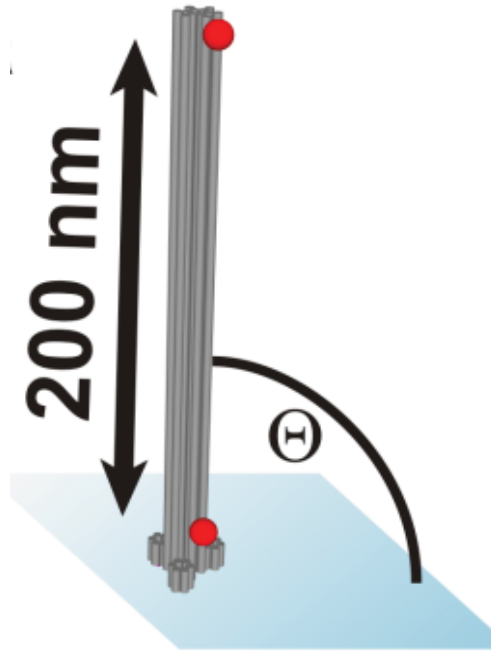


Abbildung 4.47: Schematische Darstellung der „Rakete“ mit beiden Farbstoffmolekülen (rot)[29]

Diese Struktur ist im Prinzip ein 200 nm langer Stab mit einer Bodenplatte auf der einen Seite. Die Bodenplatte trägt 15 Biotin-Moleküle mit deren Hilfe die Struktur auf die Oberfläche angebunden werden kann. Zusätzlich zu den Biotin-Molekülen sind zwei Farbstoffmoleküle angebunden, die sich am unteren bzw. oberen Ende des DNA-Origamis befinden und somit einen Abstand von 200 nm aufweisen. Schematisch ist dies in Abbildung 4.47 verdeutlicht. Die Vermessung dieses DNA-Origamis wurde mithilfe von Astigmatismus-basierter Blink-Mikroskopie durchgeführt. Die Laseranregung fand in TIRF-Konfiguration statt. Das führte zu einer geringeren Anregungsleistung für das weiter oben platzierte Farbstoffmolekül. Der Unterschied der Anregungsintensitäten für verschiedene z-Positionen lässt sich wie folgt berechnen: Zunächst lässt sich aus den Aufbau-spezifischen Werten für die Anregungswellenlänge $\lambda = 644 \text{ nm}$, die numerische Apertur $NA = 1,40$, den Brechungsindex von Öl und Glas $n_1 = 1,518$ und dem Brechungsindex der Lösung $n_2 = 1,33$ die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bestimmen:

$$d = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{NA^2 - n_2^2}} = \frac{644 \text{ nm}}{2\pi \sqrt{(1,40)^2 - (1,33)^2}} = 234 \text{ nm}$$

Daraus ergibt sich ein Intensitätsverhältnis von

$$\frac{I_{200 \text{ nm}}}{I_0} = \left(\frac{E_{200 \text{ nm}}}{E_0} \right)^2 = \left(e^{-\frac{z}{d}} \right)^2 = \left(e^{-\frac{200 \text{ nm}}{234 \text{ nm}}} \right)^2 = 0,18$$

4. Ergebnisse und Diskussion

Das würde bedeuten, dass das obere Farbstoffmolekül mit lediglich 18% der Oberflächenintensität angeregt wird und somit auch entsprechend dunkler erscheinen sollte. Das widerspricht den tatsächlichen Messungen, in denen zwar ein leichter Helligkeitsunterschied festgestellt wurde, dieser aber in keinem Fall einen Faktor von 5 wiedergab. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Diskrepanz wäre ein zu niedrig angesetzter Wert für den Brechungsindex der Lösung. Der verwendete Wert von $n_2 = 1,33$ entspricht dem Brechungsindex reinen Wassers. Die verwendete Probenlösung ist jedoch kein reines Wasser sondern enthält insbesondere oberflächennah eine Vielzahl gelöster Stoffe, wie z.B. das BSA, welches zum passivieren der Oberfläche verwendet wird. Diese gelösten Stoffe sollten den Brechungsindex der Lösung erhöhen und somit zu auch zu einer höheren Anregungsintensität oberhalb der Oberfläche führen. Generell wurde der Anregungsunterschied zwischen den beiden Farbstoffmolekülen in den Messungen vernachlässigt. Das Ziel der Messung war es, den Abstand der beiden Moleküle zu bestimmen, um dadurch die Eignung der Probe als Standard für dreidimensionale Superauflösungsmikroskopie zu demonstrieren. Zusätzlich sollte auch noch der Winkel θ zwischen Strukturachse und Ebene bestimmt werden. Dieser sollte im Idealfall 90° betragen. Um ausreichend Statistik zu erhalten, war es erforderlich, eine große Anzahl an DNA-Origami-Strukturen auszuwerten. Dies war genau wie im zweidimensionalen Fall ein zeitaufwändiger Prozess. Deshalb musste auch für diesen Fall eine Automatisierung entwickelt werden. Die im vorherigen Abschnitt entworfene automatische Auswertemethode funktioniert auch für den dreidimensionalen Fall. Dafür muss lediglich die als Boltzmann-Verteilung angenommene Funktion $c(x)$ auf drei Dimensionen erweitert werden. Somit wäre die Funktion gegeben durch

$$c(x) = ax^2e^{-bx^2} \quad (4.28)$$

Diese Methode gibt allerdings nur einen Wert für den Abstand aus. Der im dreidimensionalen Fall ebenfalls zu berechnende Winkel lässt sich damit nicht erhalten. Also musste eine völlig neue Methode entwickelt werden. Die Grundidee dafür war die Sortierung der Lokalisierungen, sodass jede Lokalisierung eindeutig einem der beiden Spots zugeordnet werden kann. Ist eine solche Zuordnung erfolgt, lassen sich Abstand und Winkel trivialerweise gewinnen. Für die Sortierung der Lokalisierungen in zwei Spots musste eine geeignete Ebene gefunden werden, die als Sortiergrenze verwendet werden konnte. Dafür wurde im ersten Schritt zunächst versucht, die Verbindungsgerade zwischen den beiden Spotmittelpunkten zu approximieren. Die erste Idee, diese Gerade zu erhalten, war folgendes Vorgehen: Auf jede Gerade aus einer Schar von möglichen Geraden wird die Projektion aller Lokalisierungen bestimmt. Somit ist jeder Lokalisierung

4. Ergebnisse und Diskussion

nun eine eindimensionale Koordinate ξ zugeordnet. Aus den ξ -Werten aller Lokalisierungen lässt sich dann die mittlere Abweichung vom Mittelwert berechnen

$$\sigma = \langle |\xi_i - \langle \xi_i \rangle| \rangle \quad (4.29)$$

Die Auswahl aus der Geradenschar erfolge dann durch Maximierung von σ . Dieses Vorgehen wird nun an zwei Spezialfällen veranschaulicht: Verläuft die getestete Gerade parallel zur Verbindungslinie der beiden Spots, werden sich auch in der Projektion zwei Maxima ergeben, was ein großes σ zur Folge hat. Verläuft die Gerade senkrecht zur Verbindungslinie, werden die Lokalisierungen beider Spots auf dasselbe Maximum abgebildet, wodurch sich ein kleiner Wert für σ ergibt. Die Maximierung nach σ wird also die erste Gerade auswählen, was genau der Intention entspricht, die Verbindungslinie zu erhalten. Die dem Maximierungsprozess zugrunde liegende Geradenschar wird dafür im ersten Schritt so ausgewählt, dass sie identisch ist mit der Menge

$$\{g | 0 \in g; \theta, \varphi \in \{0^\circ; 10^\circ; \dots 80^\circ; 90^\circ\}\}$$

Dabei ist φ der Polar- und θ der Azimutwinkel des Richtungsvektors der Geraden g . Die σ maximierende Gerade dieser Menge wird im Folgenden als g_1 bezeichnet. Die Maximierung wird nun mit folgender Geradenschar wiederholt:

$$\{g | 0 \in g; \varphi \in \{\varphi_1 - 5^\circ; \varphi_1 - 4^\circ; \dots; \varphi_1 + 5^\circ\}; \theta \in \{\theta_1 - 5^\circ; \theta_1 - 4^\circ; \dots; \theta_1 + 5^\circ\}\}$$

Dabei ist φ_1 der Polar- und θ_1 der Azimutwinkel des Richtungsvektors der Geraden g_1 . Die aus dieser Menge bestimmte Gerade kann nun als Approximation der Verbindungslinie der beiden Spots betrachtet werden. Dieses Verfahren funktioniert sehr gut, sofern die Lokalisierungsverteilungen der beiden Spots kugelsymmetrisch sind. In der Realität ist eine solche Symmetrie jedoch nicht gegeben, da beispielsweise die Lokalisierung in z-Richtung deutlich ungenauer erfolgt als in x- und y-Richtung. Somit ist entlang dieser Richtung auch der σ -Wert größer, was die Auswahl der optimalen Geraden beeinflusst und im Extremfall deutlich verfälscht. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 4.48.

4. Ergebnisse und Diskussion

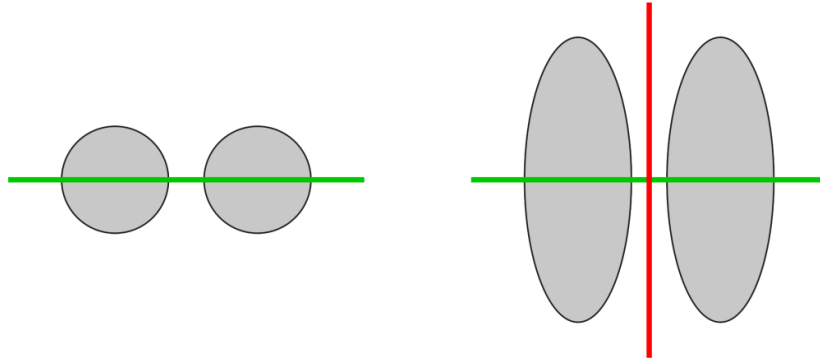


Abbildung 4.48: Die Bestimmung von g durch Maximierung der Verteilungsbreite funktioniert für kugelsymmetrische Lokalisierungsspots (links, grüne Linie). Für elliptische Lokalisierungsspots kann die Methode jedoch zu einer falschen Gerade führen (rechts, rote Linie)

Aus diesem Grund musste ein neuer zu maximierender Parameter gefunden werden. Dieser wurde ε genannt und folgendermaßen berechnet:

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{\langle(\xi_i - \langle\xi_i\rangle)^2\rangle}} = \frac{\langle|\xi_i - \langle\xi_i\rangle|\rangle}{\sqrt{\langle(\xi_i - \langle\xi_i\rangle)^2\rangle}} \quad (4.30)$$

Dieser Wert ist unabhängig von der Form der einzelnen Spots (Abbildung 4.49).

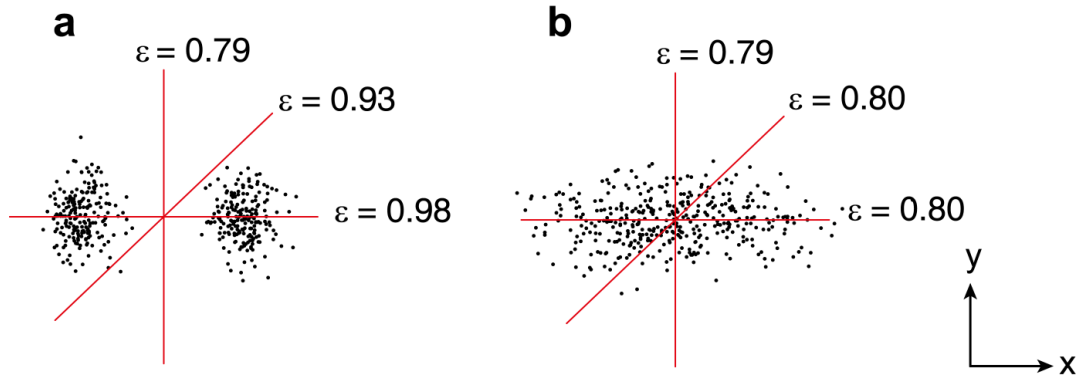


Abbildung 4.49: ε -Wert verschiedener Geraden für ein Paar kugelsymmetrischer Lokalisierungsspots (links) und einen elliptischen Spot (rechts).[29]

Das Maximierungsverfahren funktioniert nun ganz analog zu dem oben beschriebenen, wobei statt der Maximierung nach σ eine Maximierung nach ε durchgeführt wird. Die auf diese Weise gewonnene Gerade g dient nun als Basis zur Bestimmung der Trennebene. Dafür werden zunächst die Projektionen ξ auf g histogrammiert. Durch Fitten des Histogramms mit zwei Gauß-Funktionen werden die Positionen der beiden Maxima bestimmt. Der Mittelpunkt der beiden Maxima auf der Gerade wird als Punkt C bezeichnet. Als Trennebene wird nun eine Ebene definiert, die den Punkt C enthält und

4. Ergebnisse und Diskussion

zudem senkrecht von g durchlaufen wird. Nun werden alle Lokalisierungen, die sich auf derselben Seite der Ebene befinden, zu jeweils einem Spot zusammengefasst. Für jeden Spot kann dann separat der Schwerpunkt berechnet werden. Aus den Schwerpunktkoordinaten r_1 und r_2 ergibt sich dann der Abstand

$$d = |\vec{r}_1 - \vec{r}_2| \quad (4.31)$$

Und der Winkel zur Oberfläche

$$\theta = \arcsin\left(\frac{\vec{r}_1 - \vec{r}_2}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|} \cdot \hat{e}_z\right) \quad (4.32)$$

Die auf diese Weise erhaltenen Daten mussten anschließend noch gefiltert werden. Das lag hauptsächlich daran, dass nur eine Minderheit der detektierten Spots tatsächlich von korrekt gefalteten DNA-Origami-Strukturen stammte. Gefiltert wurde nach folgenden Parametern:

Parameter	Untergrenze	Obergrenze
Photonenzahl	500	-
ε -Wert	0,7	-
Standardabweichung in x und y	-	60 nm
Standardabweichung in z	-	120 nm
Spot-Abstand	150 nm	400 nm

Nun konnten die erhaltenen Längenwerte gegen die erhaltenen Winkel aufgetragen werden (Abbildung 4.50).

4. Ergebnisse und Diskussion

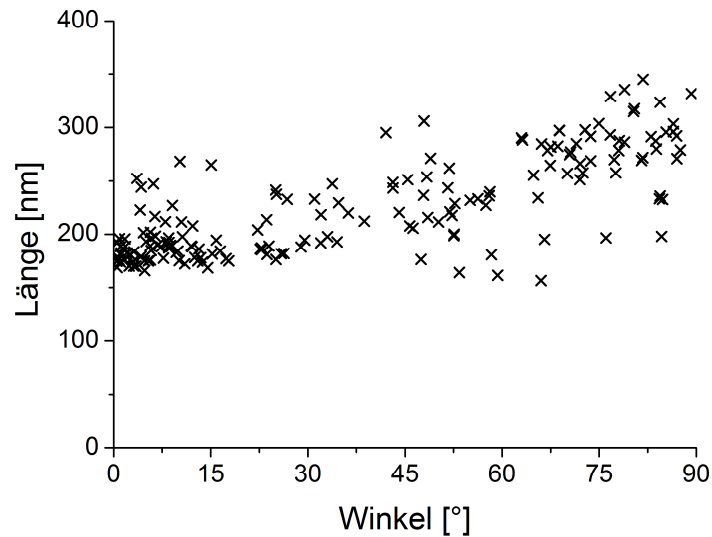


Abbildung 4.50: Gemessene Abhängigkeit der Raketenlänge von dem Winkel zwischen Rakete und Oberfläche[29]

Dabei zeigte sich, dass die Länge in Abhängigkeit des Winkels variierte. Diese Abhängigkeit konnte durch eine fehlerbehaftete z-Lokalisierung erklärt werden. Dieser Lokalisierungsfehler entsteht durch den Brechungsindex-Unterschied zwischen Kalibrierung und Messung. Aufgrund der ausschließlich oberflächennahen Kalibrierungsproben, verläuft der Lichtweg bei der Kalibrierung ausschließlich durch Immersionsöl und Glasoberfläche. Dagegen muss das Licht in der Messung die Probenlösung durchqueren, wobei die Weglänge von der z-Position des Farbstoffmoleküls abhängig ist. Abbildung 4.51 veranschaulicht diesen Effekt.

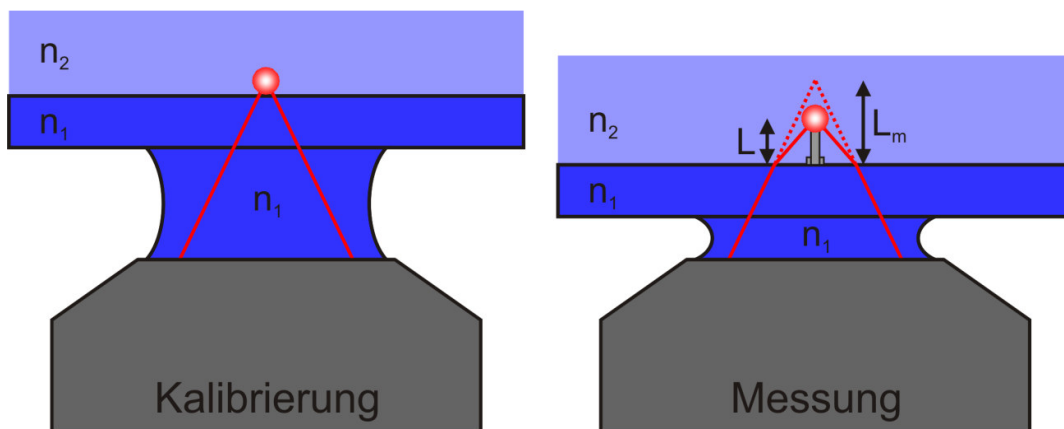


Abbildung 4.51: Veranschaulichung des z-Lokalisierungsfehlers, der aufgrund des Brechungsindexsprunges zwischen Glas und Lösung entsteht.

4. Ergebnisse und Diskussion

Dieser führt dazu, dass alle gemessenen z-Werte mit einem Korrekturfaktor f korrigiert werden müssen.[20, 67] Um den Wert dieses Faktors bestimmen zu können, musste ein Zusammenhang zwischen gemessener Länge L_m und gemessenem Winkel θ_m gefunden werden. Dafür wurde folgende Berechnung angestellt:

Die tatsächliche Länge des DNA-Origamis L ist gegeben durch

$$L^2 = x^2 + y^2 + z^2 \quad (4.33)$$

Für die gemessene DNA-Origami-Länge L_m gilt dagegen

$$L_m^2 = x^2 + y^2 + z_m^2 = x^2 + y^2 + \frac{z^2}{f^2} \Rightarrow L_m^2 - L^2 = \frac{z^2}{f^2} - z^2 \quad (4.34)$$

Der Winkel zwischen DNA-Origami-Achse und Oberfläche lässt sich berechnen durch

$$\tan^2(\theta) = \frac{z^2}{x^2 + y^2} \quad (4.35)$$

Der gemessene Winkel ist jedoch gegeben durch

$$\tan^2(\theta_m) = \frac{z_m^2}{x^2 + y^2} = \frac{z^2}{f^2(x^2 + y^2)} \Rightarrow x^2 + y^2 = \frac{z^2}{f^2 \tan^2(\theta_m)} \quad (4.36)$$

Durch Kombination der Gleichungen 4.34 und 4.36 lässt sich L_m als Funktion von θ_m darstellen.

$$\begin{aligned} L_m^2 &= \frac{z^2}{f^2 \tan^2(\theta_m)} + \frac{z^2}{f^2} = \frac{z^2}{f^2} \left(\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + 1 \right) \Rightarrow z^2 = \frac{f^2 L_m^2}{\left(\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + 1 \right)} \\ L_m^2 - L^2 &= z^2 \left(\frac{1}{f^2} - 1 \right) = \frac{f^2 L_m^2 \left(\frac{1}{f^2} - 1 \right)}{\left(\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + 1 \right)} \Rightarrow L_m^2 \left(1 - \frac{1 - f^2}{\left(\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + 1 \right)} \right) = L^2 \\ \Rightarrow L_m &= L \sqrt{\left(1 - \frac{1 - f^2}{\left(\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + 1 \right)} \right)^{-1}} = L \sqrt{\frac{\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + 1}{\frac{1}{\tan^2(\theta_m)} + f^2}} \\ &\Rightarrow L_m = L \sqrt{\frac{1 + \tan^2(\theta_m)}{1 + f^2 \tan^2(\theta_m)}} \quad (4.37) \end{aligned}$$

Gleichung 4.37 kann nun verwendet werden, um die Daten aus Abbildung 4.49 zu fitten. Dieses ist in Abbildung 4.52 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

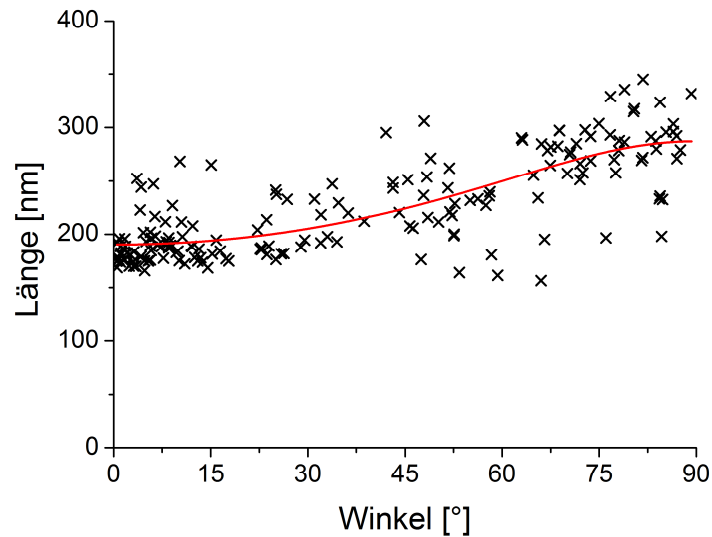


Abbildung 4.52: Gemessene Abhängigkeit der Raketenlänge von dem Winkel zwischen Rakete und Oberfläche. Der Fit gemäß Gleichung 4.37 führt zu einer realen Länge von 190 nm.[29]

Aus dem Fit ergab sich eine reale Länge von $L = (190 \pm 2) \text{ nm}$ und ein Korrekturfaktor von $f = 0,66$. Eine Auftragung der korrigierten Spot-Abstände gegen den Winkel ergab nun die zu erwartende Winkelunabhängigkeit der Länge. Das ist in Abbildung 4.53 dargestellt.

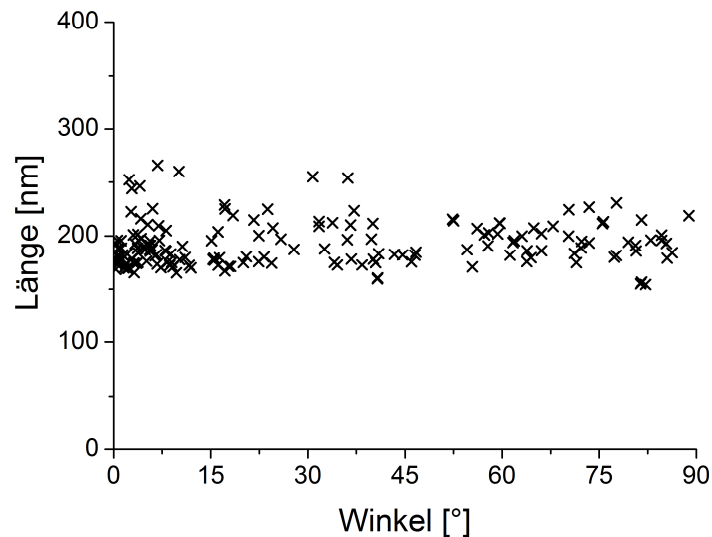


Abbildung 4.53: Korrigierte Raketenlänge gegen korrigierten Winkel zwischen Rakete und Oberfläche. Eine Winkelabhängigkeit der Länge ist nicht mehr vorhanden.[29]

Ein Histogramm der korrigierten Spot-Abstände ist in Abbildung 4.54 gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

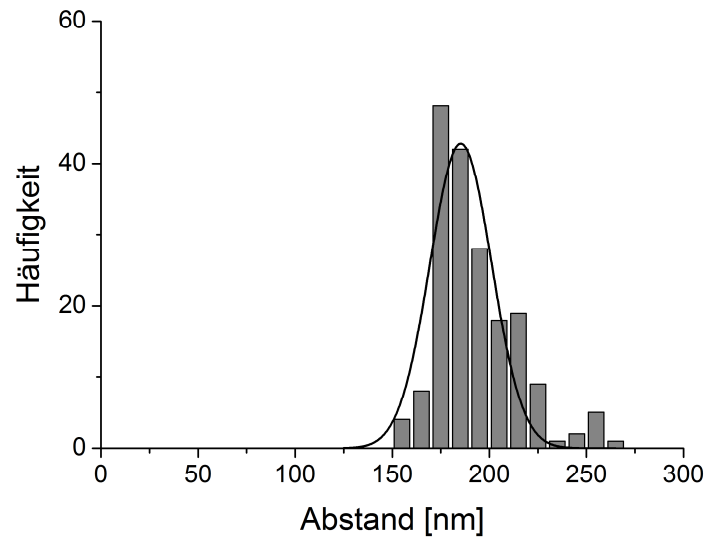


Abbildung 4.54: Histogramm der gemessenen Abstände an der Rakete

Ebenso konnte die Verteilung der Winkel bestimmt werden (Abbildung 4.55).

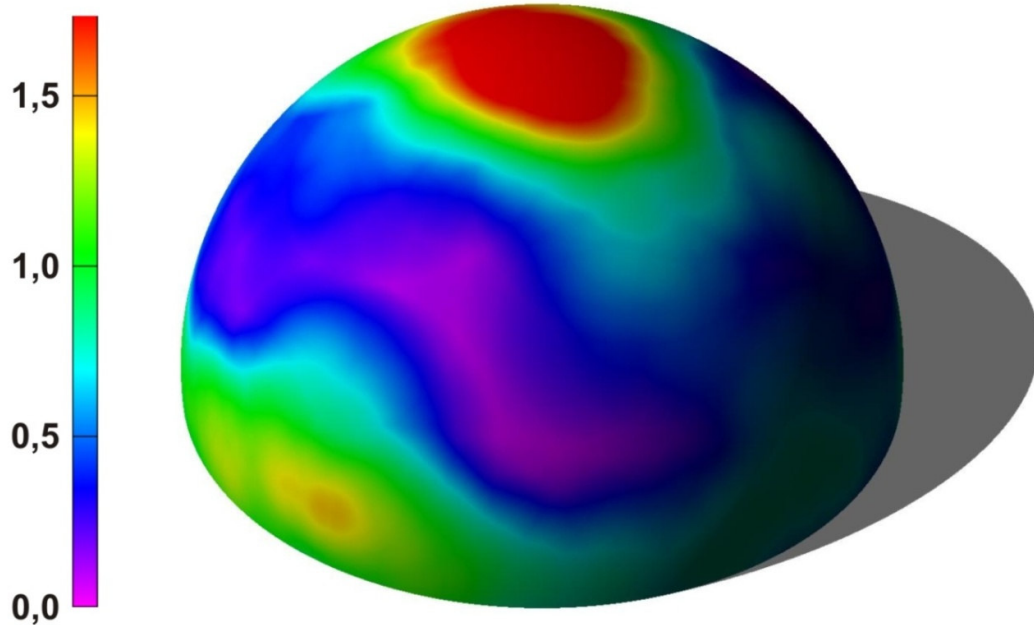


Abbildung 4.55: Gemessene Winkelverteilung der „Rakete“. Der Wert 1,0 (grün) entspricht dabei einer Gleichverteilung.[29]

In der Winkelverteilung zeigen sich zwei Populationen. Zum einen gibt es ein gehäuftes Auftreten in der Umgebung von $\theta = 90^\circ$, was näherungsweise senkrecht stehenden DNA-

4. Ergebnisse und Diskussion

Origamis entspricht. Zum anderen konzentriert sich eine weitere Population auf Gebiete mit $\theta \approx 0^\circ$. Dies entspricht DNA-Origami-Strukturen, die flach auf der Oberfläche liegen. Für Winkelbereiche zwischen den beiden Extremen ist die Wahrscheinlichkeitsdichte deutlich geringer. Das könnte damit erklärt werden, dass es attraktive Wechselwirkungen zwischen der DNA-Origami-Struktur und der Oberfläche gibt.

5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Auflösungstestproben auf unterschiedliche Superauflösungstechniken angewandt. Dabei wurde zunächst der konventionelle Ansatz gewählt und auf zelluläre Strukturen als Probe zurückgegriffen. Mithilfe dieser konnten quantitative Werte für das Auflösungsvermögen der Blink-Mikroskopie bestimmt werden. Dies gelang in-vitro und in fixierten Zellen, nicht jedoch in lebenden Zellen. Generell führte das hohe Maß an Willkürlichkeit bei der Auflösungsbestimmung über zelluläre Filamente allerdings dazu, dass diese Methode als nicht zufriedenstellend erachtet wurde. So wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, welcher darin bestand, statt Zytoskelett-Strukturen als Testprobe eine mittels Rasterkraftmikroskopie erzeugte regelmäßige Farbstoffanordnung zu verwenden. Damit war eine Bestimmung des Auflösungsvermögens auf deutlich systematischere Weise möglich. Jedoch bestand bei dieser Herangehensweise das Problem, dass die Herstellung dieser Anordnung sehr aufwendig und nicht allgemein anwendbar ist. Aus diesem Grund wurde auf die DNA-Origami-Technik als eine alternative Möglichkeit, definierte Farbstoffanordnungen zu erzeugen, zurückgegriffen. Mit diesen DNA-Origamis konnten einfach anwendbare Superauflösungsstandards sowohl für zwei-, als auch für dreidimensionale Applikationen entwickelt und etabliert werden. Dennoch gibt es einige Ansatzpunkte, die Gegenstand zukünftiger Forschung werden sollten. Einer davon wäre beispielsweise die erfolgreiche Anwendung der Blink-Mikroskopie in lebenden Zellen. In solchen war es zwar gelungen, blinkende Einzelmoleküle zu detektieren, für die Generierung eines superaufgelösten Bildes reichte es jedoch nicht. Das Hauptproblem dabei war das geringe Signal-Rausch-Verhältnis. Dieses muss weiter optimiert werden, möglicherweise durch Verwendung alternativer Farbstoffe. Dafür müssen Farbstoffe gefunden werden, die unter Bedingungen, wie sie in lebenden Zellen herrschen, ein ähnlich gutes Blink-Verhalten aufweisen wie der in dieser Arbeit verwendete Atto655, dabei allerdings eine deutlich größere Zahl an Photonen emittieren. Eine Alternative dazu wäre, die PAINT-Mikroskopie in lebenden Zellen anzuwenden, da bei dieser Methode für jede Lokalisierung deutlich mehr Photonen zur Verfügung stehen. Das Problem dabei ist jedoch das sehr hohe Hintergrundsignal, welches bei PAINT durch frei durch die Lösung diffundierende Farbstoffmoleküle verursacht wird, sobald die Lichtanregung nicht in vollständigem TIRF erfolgt. Genau dieses wäre allerdings erforderlich, wenn das Ziel der Bilgebung Zellstrukturen sind, die sich nicht auf die ventrale Membran oder deren direkte Umgebung beschränken. Ein Lösungsansatz, um die extreme TIRF-Abhängigkeit der PAINT-Mikroskopie zu verringern, könnte eine dahingehende Modifizierung des

5. Ausblick

diffundierenden Farbstoff-DNA-Konstruktes sein, welche verhindert, dass das Farbstoffmolekül abseits der Anbindungsstelle Photonen emittieren kann. Dafür würde sich das Hinzufügen eines Moleküls anbieten, das in der Lage ist, den Farbstoff zu löschen. Dabei müsste natürlich sichergestellt werden, dass der Kontakt zwischen Löschungs- und Farbstoffmolekül unterbrochen, sobald das Konstrukt an die Anbindungsstelle hybridisiert. Im Idealfall sollte dieser Vorgang reversibel sein, sodass der Farbstoff nach dem Abbinden erneut gelöscht wird. Wenn allerdings sichergestellt ist, dass die mittlere Anbindungszeit die mittlere Lebensdauer des Farbstoffs deutlich übersteigt, so wäre dies nicht von Nöten. Für eine verbesserte PAINT-Mikroskopie sollten dann auch Standards entwickelt werden können, die ebenso zufriedenstellend funktionieren wie die Standards für Blink-Mikroskopie oder dSTORM. Die funktionierenden Standards sollten ferner direkt mit Anwendungsmessungen kombiniert werden, d.h. es müssen superauflösende Messungen durchgeführt werden, bei denen in der Probe simultan sowohl die zu vermessende Struktur, als auch DNA-Origami-basierte Standards vorliegen. Auf diese Weise können DNA-Origami-Standards u.a. auch genutzt werden, um zu klären, ob eventuell auftretende Probleme von der Probenseite oder eher vom Messaufbau herrühren, was die anschließende Fehlerbehandlung vereinfacht. Auch in den Algorithmen, die für die automatisierte Auswertung entworfen wurden, ergibt sich noch einiges an Entwicklungspotenzial. In ihrer momentanen Form sind sie sehr speziell auf bestimmte zwei- oder dreidimensionale Superauflösungsstandards zugeschnitten. So funktioniert der Analysealgorithmus, der für die in dieser Arbeit verwendeten dreidimensionalen Standards entwickelt wurde, zwar sehr erfolgreich für ebendiese Strukturen, ließe sich aber nicht ohne weiteres auf davon abweichende Strukturen anwenden. Ein Beispiel dafür wäre eine Struktur, die zusätzlich zu den beiden Farbstoffmolekülen an den jeweiligen Enden noch ein weiteres Molekül in der Mitte trägt. Dieses hätte den Vorteil einer besseren Unterscheidbarkeit von korrekt und fehlerhaft gefalteten DNA-Origamis.

6. Referenzen

6. Referenzen

1. Campbell und Reece, *Biologie*. 2003.
2. S. Hell, *Far-Field Optical Nanoscopy*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1153-1158.
3. G. Binning, H. Rohrer, C. Gerber und E. Weibel, *Surface studies by scanning tunneling microscopy*. Physical Review Letters, 1982. **49**(1): p. 57-61.
4. G. Binning, F. Quate und C. Gerber, *Atomic force microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
5. T. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egnér und S. Hell, *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(15): p. 8206–8210.
6. E. Betzig, G. Patterson, R. Sougrat, O. Lindwasser, S. Olenych, J. Bonifacino, M. Davidson, J. Lippincott-Schwartz und H. Hess, *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645
7. M. Rust, M. Bates und X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nat. Methods, 2006. **3**: p. 793 - 796.
8. M. Heilemann, S.v.d. Linde, M. Schüttelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld und M. Sauer, *Fluoreszenzmikroskopie unterhalb der optischen Auflösungsgrenze mit konventionellen Fluoreszenzsonden*. Angew Chem Int Ed, 2008. **120**(33): p. 6266-6271.
9. S. Hess, T. Girirajan und M. Mason, *Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*. Biophys. J., 2006. **91**(11): p. 4258–4272.
10. C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang und P. Tinnefeld, *Superresolution microscopy based on engineered dark states*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(50): p. 16840–16841.
11. J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer und P. Tinnefeld, *Ein System aus Reduktions- und Oxidationsmittel Verringert*

6. Referenzen

- Photobleichen und Blinken von Fluoreszenzfarbstoffen*. Angew Chem Int Ed, 2008. **120**(29): p. 5545-5550.
12. A. Sharanov und R. Hochstrasser, *Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006. **103**: p. 18911-18916.
 13. R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kunzyk, P. Tinnefeld und F. Simmel, *Single-Molecule Kinetics and Super-Resolution Microscopy by Fluorescence Imaging of Transient Binding on DNA Origami*. Nano Letters, 2010. **10**(11): p. 4756–4761.
 14. S. Berning, K. Willig, H. Steffens, P. Dibaj und S. Hell, *Nanoscopy in a living mouse brain*. Science, 2012. **335**(6068): p. 551.
 15. S. Shim, C. Xia, G. Zhong, H. Babcock, J. Vaughan, B. Huang, X. Wang, C. Xu, G. Bi und X. Zhuang, *Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes*. Proc Natl Acad Sci USA, 2012. **109**(35): p. 13978-13983.
 16. <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/details/product/leica-tcs-sted-cw-2/>. [2012 20. 12.].
 17. http://www.nikoninstruments.com/en_DE/Products/Microscope-Systems/Inverted-Microscopes/N-STORM-Super-Resolution. [2012 20. 12.].
 18. B. Hein, K. Willing und S. Hell, *Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008. **105**(38): p. 14271-14276.
 19. J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling und S. Hell, *Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single molecule return*. Nat. Methods, 2008. **5**: p. 943-945.
 20. B. Huang, W. Wang, M. Bates und X. Zhuang, *Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*. Science, 2008. **319**(5864): p. 810-813.

6. Referenzen

21. M. Heilemann, S.v.d. Linde, A. Mukherjee und M. Sauer, *Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores*. Angew Chem Int Ed, 2009. **48**(37): p. 6903-6908.
22. M. Gustafsson, L. Shao, P. Carlton, C. Wang, I. Golubovskaya, W. Cande, D. Agard und S. Sedat, *Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination*. Biophys. J., 2008. **94**(12): p. 4957-4970.
23. T. Dertinger, R. Colyer, R. Vogel, J. Enderlein und S. Weiss, *Achieving increased resolution and more pixels with Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI)*. Opt Express, 2010. **18**(18): p. 18875-18885.
24. S. Bretschneider, C. Eggeling und S. Hell, *Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving*. Phys. Rev. Lett., 2007. **98**(21): p. 218103.
25. J. Vogelsang, T. Cordes, C. Forthmann, C. Steinhauer und P. Tinnefeld, *Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. **106**(20): p. 8079-8080.
26. T. Cordes, M. Strackharn, S. Stahl, W. Summerer, C. Steinhauer, C. Forthmann, E. Puchner, J. Vogelsang, H. Gaub und P. Tinnefeld, *Resolving single-molecule assembled patterns with superresolution blink-microscopy*. Nano Letters, 2010. **10**: p. 645-651.
27. P. Rothemund, *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. Nature, 2006. **440**: p. 297-302.
28. J. Schmied, A. Gietl, P. Holzmeister, C. Forthmann, C. Steinhauer, T. Dammeyer und P. Tinnefeld, *Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami*. Nat. Methods, 2012. **9**: p. 1133–1134.
29. C. Forthmann, J. Schmied, E. Pibiri, B. Lalkens, P. Nickels, T. Liedl und P. Tinnefeld, *DNA origami nanopillars as standards for three-dimensional superresolution microscopy*. Nano Letters, 2013. **13**(2): p. 781-785.
30. <http://de.wikipedia.org/wiki/Franck-Condon-Prinzip>. [2012 20. 12.].

6. Referenzen

31. <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/21235p72.jpg>. [2012 20. 12.].
32. D. English, E. Harbron und P. Barbara, *Probing photoinduced intersystem crossing by two-color, double resonance single molecule spectroscopy*. J. Phys. Chem. A, 2000. **104**(40): p. 9057-9061.
33. P. Tinnefeld, J. Hofkens, D. Hertel, S. Masuo, T. Vosch, M. Cotlet, S. Habuchi, K. Müllen, F.D. Schryver und M. Sauer, *Higher-excited-state photophysical pathways in multichromophoric systems revealed by single-molecule fluorescence spectroscopy*. ChemPhysChem, 2004. **5**(11): p. 1786-1790.
34. P. Tinnefeld und M. Sauer, *Neue Wege in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie: Herausforderungen für die Chemie und Einfluss auf die Biologie*. Angew Chem Int Ed, 2005. **117**(18): p. 2698-2728.
35. R. Yuste, *Fluorescence microscopy today*. Nat. Methods, 2005. **2**(12): p. 902-904.
36. C. Aitken, R. Marshall und J. Puglisi, *An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments*. Biophys. J., 2008. **94**(5): p. 1826-1835.
37. P. Tinnefeld, V. Buschmann, K. Weston und M. Sauer, *Direct observation of collective blinking and energy transfer in a bichromophoric system*. J. Phys. Chem. A, 2003. **107**(3): p. 323-327.
38. Gerthsen, Kneser und Vogel, *Physik*. 1982.
39. http://www3.mpibpc.mpg.de/groups/hell/PRESS_Detail_PRL_10.pdf. [2012 20. 12.].
40. R. Thompson, D. Larson und W. Webb, *Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes*. Biophys. J., 2002. **82**(5): p. 2775–2783.
41. M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer und P. Tinnefeld, *Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(11): p. 3801-3806.
42. M. Gordon, T. Ha und P. Selvin, *Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**(17): p. 6462–6465.

6. Referenzen

43. C. Steinhauer, R. Jungmann, T. Sobey, F. Simmel und P. Tinnefeld, *DNA-Origami als Nanometerlineal für die superauflösende Mikroskopie*. Angew Chem Int Ed, 2009. **121**(47): p. 9030–9034.
44. Kleinig und Sitte, *Zellbiologie*. 1999.
45. <http://nikon2.magnet.fsu.edu/moviegallery/livecellimaging/3t3/index.html>. [2012 20. 12.].
46. G. Todaro und H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. J. Cell Biol., 1962: p. 299-313.
47. R. Watkins und C. Robertson, *A total internal reflection technique for the examination of protein adsorption*. J. Biomed. Matter. Res., 1977. **11**(6): p. 915-938.
48. C. Forthmann, *Entwicklung eines Mikroskopie-Verfahren mit nicht beugungsbegrenzter optischer Auflösung auf der Basis von generierten Dunkelzuständen*. 2008, LMU: München.
49. P. Prabhat, S. Ram, E. Ward und R. Ober, *Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions*. IEEE Transactions on Nanobioscience, 2004. **3**(4): p. 237-242.
50. M. Juetten, T. Gould, M. Lessard, M. Mlodzianoski, B. Nagpure, B. Bennett, S. Hess und J. Bewersdorf, *Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples*. Nat. Methods, 2008. **5**: p. 527-529.
51. S. Kron und J. Spudich, *Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface*. Proc Natl Acad Sci USA, 1986. **83**(17): p. 6272-6276.
52. R. Kasper, B. Harke, C. Forthmann, P. Tinnefeld, S. Hell und M. Sauer, *Single-molecule STED with photostable organic fluorophores*. SMALL, 2010. **6**(13): p. 1379-1384.
53. J. Bednar, P. Furrer, V. Katritch, A. Stasiak, J. Dubochet und A. Stasiak, *Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy*. Separation

6. Referenzen

- of the static and dynamic contributions to the apparent persistence Length of DNA.* J. Mol. Biol., 1995. **254**: p. 579-594.
54. C. Steinhauer, C. Forthmann, R. Jungmann, J. Vogelsang, F. Simmel und P. Tinnefeld, *Nanoscopy Using Localization and Temporal Separation of Fluorescence from Single Molecules*, in *Biophotonics: Spectroscopy, Imaging, Sensing, and Manipulation, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics*, B. D. Bartolo, J. Collins (Eds.), Springer. 2011.
55. J. Vogelsang, T. Cordes, C. Steinhauer, C. Forthmann und P. Tinnefeld, *Intrinsically resolution enhancing probes for confocal microscopy.* Nano Letters, 2010. **10**(2): p. 672–679.
56. U. Rotbauer, K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Schermelleh, A. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, S. Muyldermans, M. Cardoso und H. Leonhardt, *Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies.* Nat. Methods, 2006. **3**: p. 887-889.
57. <http://www.chromotek.com/home/technology/chromobodies/>. [2013 22. 01.].
58. S. Kufer, E. Puchner, H. Gump, T. Liedl und H. Gaub, *Single-molecule cut-and-paste surface assembly.* Science, 2008. **319**(5863): p. 594-596.
59. J. Chen und N. Seeman, *Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube.* Nature, 1991. **350**(6319): p. 631-633.
60. Y. Zhang und N. Seeman, *Construction of a DNA-truncated octahedron.* J Am Chem Soc, 1994. **116**(5): p. 1661-1669.
61. J. Zimmermann, M. Cebulla, S. Mönninghoff und G.v. Kiedrowski, *Self-assembly of a DNA dodecahedron from 20 trisoligonucleotides C_{3h} linkers.* Angew Chem Int Ed, 2008. **47**(19): p. 3626-3630.
62. Z. Li, B. Wei, J. Nangreave, C. Lin, Y. Liu, Y. Mi und H. Yan, *A replicable tetrahedral nanostructure self-assembled from a single DNA strand.* J Am Chem Soc, 2009. **131**(36): p. 13093-13098.

6. Referenzen

- 63. D. Smith, V. Schüller, C. Forthmann, R. Schreiber, P. Tinnefeld und T. Liedl, *A structurally variable hinged tetrahedron framework from DNA origami*. Journal of Nucleic Acids 2011.
- 64. F. Mathieu, S. Liao, J. Kopatsch, T. Wang, C. Mao und N. Seeman, *Six-helix bundles designed from DNA*. Nano Letters, 2005. **5**(4): p. 661-666.
- 65. T. Liedl, B. Högberg, J. Tytell, D. Ingberg und W. Shih, *Self-assembly of 3D prestressed tensegrity structures from DNA*. Nat. Nanotechnol, 2010. **5**(7): p. 520-524.
- 66. G. Acuña, F. Möller, P. Holzmeister, S. Beater, B. Lalkens und P. Tinnefeld, *Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas*. Science, 2012. **338**(6106): p. 506-510.
- 67. A. Egner und S. Hell, *Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J. Pawley, Editor. 2006, Springer: New York. p. 404-413.

7. Abbildungsverzeichnis

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Beispiel für Blink-Mikroskopie	10
Abbildung 2.1: Franck-Condon-Prinzip	12
Abbildung 2.2: Stokes-Verschiebung	14
Abbildung 2.3: Jablonski-Diagramm	15
Abbildung 2.4: An- und Auszeiten von ATTO655	17
Abbildung 2.5: STED-Mikroskopie	22
Abbildung 2.6: Punktabbildungsfunktion	24
Abbildung 2.7: Prinzip der Lokalisierungsmikroskopie	25
Abbildung 2.8: Prinzip der DNA-Origami-Technik	28
Abbildung 2.9: Fibroblastenzelle	30
Abbildung 3.1: Versuchsaufbau	31
Abbildung 3.2: Detektionsfläche einer EMCCD-Kamera	34
Abbildung 3.3: Astigmatismus-basierte z-Lokalisierung	36
Abbildung 3.4: Kalibrierung eines 3d-Mikroskops	37
Abbildung 3.5: BSA-Biotin-Oberfläche	38
Abbildung 3.6: Schema der Spot-Erkennung	42
Abbildung 4.1: PSF-Breite gegen STED-Intensität	44
Abbildung 4.2: Rotierbarkeit eines gebundenen Farbstoffmoleküls	45
Abbildung 4.3: PSF-Breite gegen Linker-Länge	46
Abbildung 4.4: PSF-Breite gegen Grenzwinkel	47
Abbildung 4.5: Photonenzahl gegen Integrationszeit	49
Abbildung 4.6: Lokalisierungsgen. gegen Integrationszeit (theoretisch)	50
Abbildung 4.7: Lokalisierungsgen. gegen Integrationszeit (experimentell)	51
Abbildung 4.8: Blink-Mikroskopie an Aktinfilamenten in vitro	53
Abbildung 4.9: Blink-Mikroskopie an Aktinfilamenten in vitro mit O ₂	54
Abbildung 4.10: Blink-Mikroskopie in einer fixierten Zelle	55
Abbildung 4.11: Blink-Kinetik in einer lebenden Zelle	57
Abbildung 4.12: Blink-Mikroskopie in einer lebenden Zelle	58
Abbildung 4.13: Blink-Mikroskopie mit Nanokörpern in einer fixierten Zelle	59
Abbildung 4.14: Blink-Mikroskopie mit Nanokörpern in einer lebenden Zelle	59
Abbildung 4.15: Anordnung simulierter Farbstoffmoleküle	61
Abbildung 4.16: Gitterauflösbarkeit gegen Linienabstand (simuliert)	62
Abbildung 4.17: Prinzip der SMCP-Methode	63

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.18: Blink-Mikroskopie an erzeugten Gitterstrukturen	64
Abbildung 4.19: Gitterauflösbarkeit gegen Linienabstand (experimentell)	65
Abbildung 4.20: Auflösung gegen Auszeit-Anzeit-Verhältnis	66
Abbildung 4.21: Tetraeder-Struktur	67
Abbildung 4.22: PAINT-Mikroskopie an Tetraeder-Strukturen	68
Abbildung 4.23: Six-Helix-Bundle mit zwei PAINT-Gruppen	69
Abbildung 4.24: PAINT-Bild von Six-Helix-Bundles mit zwei PAINT-Gruppen	69
Abbildung 4.25: Abstandshistogramm der zwei PAINT-Gruppen	70
Abbildung 4.26: Six-Helix-Bundle mit drei PAINT-Gruppen	71
Abbildung 4.27: PAINT-Bild von Six-Helix-Bundles mit drei PAINT-Gruppen	71
Abbildung 4.28: Abstandshistogramm der drei PAINT-Gruppen	72
Abbildung 4.29: Abstandssummenhistogramm der drei PAINT-Gruppen	73
Abbildung 4.30: PAINT-Bleichspur ohne rotem Farbstoff	74
Abbildung 4.31: PAINT-Bleichspur mit rotem Farbstoff	74
Abbildung 4.32: PAINT-Bleichspur mit rotem Farbstoff und Trolox	75
Abbildung 4.33: DNA-Chip	76
Abbildung 4.34: Abstandshistogramm des DNA-Chips	77
Abbildung 4.35: DNA-Origami-Rechteck	78
Abbildung 4.36: Superauflösung am DNA-Rechteck	79
Abbildung 4.37: Abstandshistogramm des Rechtecks mit Blink-Mikroskopie	79
Abbildung 4.38: Abstandshistogramm des Rechtecks mit SHRImp	80
Abbildung 4.39: Abstandshistogramm des 60nm-Rechtecks	81
Abbildung 4.40: Abstandshistogramm des 40nm-Rechtecks	81
Abbildung 4.41: Lokalisierungsabstandshistogramme für Doppelspots	83
Abbildung 4.42: Lokalisierungsabstandshistogramm für einen Einzelspot	84
Abbildung 4.43: Simuliertes Lokalisierungsabstandshistogramm für 40 nm	85
Abbildung 4.44: Gemessenes Lokalisierungsabstandshistogramm für 60 nm	86
Abbildung 4.45: Gemessenes Lokalisierungsabstandshistogramm für 40 nm	86
Abbildung 4.46: Parametrisierung des Lokalisierungsabstandshistogrammes	87
Abbildung 4.47: Nanosäule (Rakete)	88
Abbildung 4.48: Fehlerhafte Bestimmung der Achsenlinie eines Doppelspots	91
Abbildung 4.49: ϵ -Wert für verschiedene Geraden	91
Abbildung 4.50: Gemessenen Raketenlänge gegen gemessenen Winkel	93
Abbildung 4.51: z-Lokalisierungsfehler durch Brechungsindexsprung	93

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.52: Raketenlänge gegen den Winkel mit Kurvenanpassung	95
Abbildung 4.53: Korrigierte Raketenlänge gegen den Winkel	95
Abbildung 4.54: Histogramm der korrigierten Raketenlänge	96
Abbildung 4.55: Korrigierte Winkelverteilung der Rakete	96

8. Danksagung

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen und deren Gelingen überhaupt erst ermöglicht haben.

Zuallererst gilt mein Dank natürlich Prof. Dr. Philip Tinnefeld, der mich über all die Jahre hervorragend betreut hat. Dabei sind ihm nie die guten Ideen, Anregungen und Vorschläge bezüglich neuer Projekte ausgegangen und er ist stets geduldig und diskussionsbereit geblieben, wenn deren Realisierung und Umsetzung nicht immer ganz so planmäßig verliefen. Ebenso möchte ich mich bei ihm für das überaus lockere, aber dennoch sehr produktive Arbeitsklima bedanken, das er uns ermöglicht hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich ebenso bei Christian Steinhauer und Jan Vogelsang, die mich während meiner Diplomarbeit an das Gebiet der Fluoreszenz-Mikroskopie herangeführt und ihr fundiertes Fachwissen mit mir geteilt und geduldig an mich weiter gegeben haben.

Für die Zusammenarbeit bei der Programmierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Software und der Entwerfung und Entwicklung von Algorithmen möchte ich mich vor allem bei Christian Steinhauer, Jürgen Schmied, Sebastian Laurien und Andreas Gietl bedanken.

Für die Hilfe bei der Handhabung der biologischen Proben, insbesondere der Pflege von Zelllinien, möchte ich mich bei Christian Steinhauer, Thomas Nicolaus, Angelika Kardinal und Michelle Itano bedanken.

Aufgrund der Zusammen am STED-Projekt, möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sauer und im Besonderen bei Robert Kasper bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Thorben Cordes und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hermann Gaub für die Zusammenarbeit bei der Erzeugung und Auswertung der regulären Farbstoffgitter.

Zudem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tim Liedl, insbesondere bei Verena Schüller, Robert Schreiber, und Philipp Nickels für die Bereitstellung der verwendeten DNA-Origami-Strukturen und gemeinsame Messungen an diesen bedanken.

Für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Entwicklung der zwei- und dreidimensionalen Superauflösungsstandards möchte ich mich ganz besonders bei

8. Danksagung

Jürgen Schmied, Andreas Gietl und Phil Holzmeister bedanken. Ebenso gebührt an dieser Stelle nochmals Dank Christian Steinhauer, der die ursprüngliche Idee dazu hatte.

Eine sehr große Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Dissertation waren die zahlreichen Vorschläge, Anregungen und Kommentare von Andreas Gietl, Jürgen Schmied, Philip Tinnefeld, Dina Grohmann und Phil Holzmeister. Für die Mühe und Geduld möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Allgemein möchte ich Christian Steinhauer für die gemeinsame Arbeit am Setup in München und Jürgen Schmied für die am Setup in Braunschweig danken, insbesondere für das hervorragende Arbeitsklima beim Planen, Justieren, Aufbauen, Abbauen, Umbauen, Neujustieren, Messen mit guten Ergebnissen, Messen mit suboptimalen Ergebnissen, Messen ohne jegliche Ergebnisse, Freuen und Verzweifeln.

Für das sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima im Büro möchte ich mich bei meinen ehemaligen Bürokollegen in München Christian Steinhauer und Ingo Stein bedanken.

Der Dank für das ebenso tolle Büroklima in Braunschweig gilt Thorben Dammeyer, Jürgen Schmied und Ija Jusuk. Insbesondere Ija sorgte dabei mit ihrer erfrischend redseligen Art für eine angenehm lockere und überaus kurzweilige Büroatmosphäre.

Ferner möchte ich mich bei Kirsten-Illona Talk und Angela Tiefnig bedanken, die stets für einen reibungslosen Ablauf alles Organisatorischen in der Arbeitsgruppe gesorgt haben.

Für die vielen, vielen gemeinsamen Stunden am Kickertisch, die den Kopf frei machten, wenn mal wieder gar nichts voranging, bedanke ich mich bei Andreas Gietl, Dina Grohmann, Thorben Dammeyer, Jürgen Schmied, Marita Overhoff, Mario Raab, Philip Tinnefeld, Phil Holzmeister, Enrico Pibiri, Alexander Gust und Ija Jusuk.

Die massive Aufwertung der Stadt Braunschweig durch ein soziales Leben außerhalb der Arbeit (gelegentlich auch mit etwas C_2H_5OH) verdanke ich vor allem Andreas Gietl, Ija Jusuk, Jürgen Schmied, Mario Raab, Guillermo Acuña, Sarah Schulz, Phil Holzmeister, Dina Grohmann, Marita Overhoff, Enrico Pibiri, Philip Tinnefeld, Alexander Gust, Thorben Dammeyer, Susanne Beater und Adrian Zander. Ich werde euch sehr vermissen!

8. Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt aber meinen Eltern und meiner Schwester Mareike, die mich immer unterstützt und mir familiären Rückhalt gegeben haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!